

**УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**



**ХИСТОЛОШКА СТУДИЈА УЗРАСНИХ ПРОМЕНА
ЉУДСКЕ КОЖЕ НА ФОТОЕКСПОНИРАНИМ И
ФОТОНЕЕКСПОНИРАНИМ РЕГИЈАМА**

Докторска дисертација

Ментор:
Проф. др Горана Ранчић

Кандидат:
Асс. др Снежана Лештаревић

Косовска Митровица, 2014.

Огромну захвалност дугујем свом ментору, Проф. др Горани Ранчић, која ме је стрпљиво и професионално усмеравала током израде докторске дисертације, преносећи ми своје знање, искуство и указујући истовремено на прави пут у професионалном развоју.

Захваљујем се Доц. др Слађани Савић, драгој колегиници на разумевању, корисним сугестијама и пријатељским саветима.

Доц. др Милице Мијовић захваљујем се на стручној помоћи, корисним саветима у изради и тумачењу имунохистохемијских препарата, као и свеукупној сарадњи током израде ове докторске дисертације.

Проф. др Златибору Анђелковићу, Проф. др Предрагу Мандићу и Проф. др Ивани Бинић, захваљујем се на помоћи при оцени ове дисертације и учешћу у Комисији.

Посебну захвалност дугујем својим родитељима, Невенки и пок. Градимиру, на разумевању, подстреку и несебичној подршци.

Захваљујем се и свом сунругу Проф. др Миомиру Леитаревећу и кћеркама Неди и Сањи, на огромном стрпљењу, несебичној подршци и активној помоћи током израде ове дисертације, као и за сву љубав и пажњу коју ми пружају свих ових година .

САДРЖАЈ

1. УВОД	01
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	02
2.1. Хистолошка грађа коже	02
2.1.1. Епидермис	03
2.1.1.1. Слојеви епидермиса	03
2.1.1.2. Кератиноцити и кератинизација	03
2.1.1.3. Меланоцити и меланогенеза	07
2.1.1.4. Лангерхансове ћелије	11
2.1.1.5. Меркелове ћелије	14
2.1.2. Дермно-епидермни спој (зона базалне мембране)	14
2.1.3. Дермис	15
2.1.3.1. Ћелије дермиса	16
2.1.3.1.1. Фибробласти	16
2.1.3.1.2. Мастоцити	18
2.1.3.1.3. Макрофаги	20
2.1.3.2. Екстрацелуларни матрикс	22
2.1.3.2.1. Колагена влакна у дермису	22
2.1.3.2.2. Еластична влакна у дермису	25
2.1.3.2.3. Основна супстанца (аморфни матрикс)	27
2.1.4. Васкуларизација коже	28
2.2. Имунохистохемијски параметри	30
2.2.1. Васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF)	30
2.2.2. Тумор протеин Р53	31
2.2.3. Виментин	33
2.3. Ембрионални развој коже	34
2.4. Старење коже	36
2.4.1. Опште теорије старења	36
2.4.2. Старење коже	38
2.4.2.1. Утицај полних хормона на старење коже	38
2.4.2.2. Улога слободних радикала у процесу старења	40
2.4.2.2.1. Слободни радикали	40
2.4.2.2.2. Механизам деловања слободних радикала	42
2.4.2.2.3. Реактивне врсте кисеоника (ROS)	42
2.4.2.2.4. Оксидациони стрес (OC)	43
2.4.2.2.5. Фотостарење и оксидациони стрес	44

2.5. Хистолошке карактеристике старења коже.....	50
2.5.1. Хистолошке карактеристике хронолошког старења.....	50
2.5.2. Хистолошке карактеристике фотостарења.....	54
2.5.3. UV и карциногенеза.....	58
3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	59
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	61
4.1. Материјал.....	61
4.1.1. Узрасна дистрибуција.....	61
4.1.2. <i>Punch</i> техника узимања кожних блокова.....	62
4.2. Методе.....	63
4.2.1. Хистолошке, хистохемијске и имунохистохемијске методе.....	63
4.2.2. Квантитативна детерминација дебљине слојева коже, колагених и еластичних влакана, основне супстанце, васкулатуре, меланина и хелијских популација коже.....	65
4.2.3. Статистичка обрада података.....	68
5. РЕЗУЛТАТИ.....	70
5.1. Хистолошке карактеристике фотоекспониране и фотонеекспониране	
коже.....	70
5.1.1. Хистолошка анализа коже фетуса и новорођенчади.....	70
5.1.2. Хистолошка анализа коже особа раног животног доба.....	72
5.1.3. Хистолошка анализа коже особа средњег животног доба.....	75
5.1.4. Хистолошка анализа коже особа позног животног доба.....	77
5.1.5. Хистолошка анализа коже особа старијих од 60 година.....	81
5.1.6. Општа организација и дебљина вијабилног епидермиса.....	84
5.1.7. Општа организација и дебљина <i>Stratum corneum</i> -а.....	88
5.1.8. Површина дермно-епидермног споја.....	91
5.1.9. Општа организација и дебљина дерма.....	95
5.1.10. Морфометријско одређивање дебљине коже.....	97
5.2. Хистохемијска анализа фотоекспониране и фотонеекспониране	
коже.....	98
5.2.1. Општа организација и заступљеност колагена.....	98
5.2.2. Општа организација и заступљеност васкуларне мреже	107
5.2.3. Општа организација и заступљеност основне супстанце у екстрацелуларном матриксу.....	110

5.2.4. Општа организација и заступљеност еластичних влакана.....	114
5.2.5. Дистрибуција и квантификација мастоцита.....	120
5.2.6. Дистрибуција и квантификација меланина.....	126
5.3.Имунохистохемијска анализа фотоекспониране и фотонеекспониране коже.....	132
5.3.1. Дистрибуција и квантификација антиген-презентујућих ћелија.....	132
5.3.2. Дистрибуција и квантификација меланоцита.....	141
5.3.3. Дистрибуција и квантификација макрофага.....	144
5.3.4. Имунохистохемијски резултати експресије васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF).....	149
5.3.5. Имунохистохемијски резултати експресије виментина.....	152
5.3.6. Имунохистохемијски резултати експресије онкопротеина p53.....	157
6. ДИСКУСИЈА.....	162
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	231
8. ЛИТЕРАТУРА.....	236

1.УВОД

„Старим колико морам, подмлађујем се колико могу“.

Иво Андрић

Кожа је комплексни посредник између организма човека и спољашње средине. Она чини перманентну баријеру према многобројним физичким, хемијским и биолошким деловањима из околине, те самим тим трпи огроман утицај свих егзогених фактора који делују на људски организам. Истовремено, због чињенице да је највидљивији део нашег тела, на кожи се најлакше манифестују све промене које су последице процеса старења.

Старење коже је спор, али прогресиван дегенеративни процес, непосредно повезан са старењем осталих органа и организма у целини. У литератури се јасно одвајају и дефинишу две варијанте биолошких околности старења коже. Прва објашњава природно, физиолошко, инволутивно старење, углавном у функцији времена, тзв. хронолошко или интринзичко старење (engl.chronological/intrinsic skin aging) које за последицу има слабљење важних функција коже, као што су баријерна, механичка, заштитна, имунска, ендокрина, ресорптивна, терморегулаторна итд.

Друга варијанта повезује и анализира промене на кожи настале под утицајем спољних чинилаца, углавном ултравиолетног (UV) зрачења - тзв. соларно, екстринзичко или фотостарење (engl. photoaging/extrinsic skin aging), а које се запажају искључиво на регионима коже пролонгирано изложеним Сунцу. Фотостарење за последицу има развој преканцероза и канцера коже, као и малигног меланوما. Чињеница да већина људи испољава барем неке знакове соларног оштећења коже пре 50. године живота, а да инциденција базоцелуларног и спиноцелуларног карцинома коже, као и малигног меланوما, у појединим деловима света са дужом просечном инсолацијом достиже епидемијске размере, ставља ову тему у жижу научног интересовања.

Процес старења коже прати нарушавање синхроних међућелијских интеракција у кожи, условљених анатомским контактима и деловањем широког спектра сигналних молекула. Усаглашено деловање ћелијских компоненти епидермиса и дермиса, васкулатуре и микроокружења у значајном степену одређује способност одржавања хомеостазе коже и могућност реаговања на деловање унутрашње и спољашње средине.

Наша је претпоставка да се праћењем бројности и дистрибуције ћелија које су градивни елементи коже, појединих врста ћелија имунског система присутних у кожи, као и заступљености структурних елемената, попут основне супстанце, васкуларне мреже, колагених и еластичних влакана, може доћи до нових и значајних сазнања везаних за генезу старења коже, односно специфичности хронолошког и фотостарења. Уједно верујемо, да се дубљим проницањем у ћелијске и молекуларне основе, као и ћелијско-матриксне интеракције овог феномена, отвара могућност за предлагање нових, како превентивних, тако и терапијских стратегија.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Хистолошка грађа коже

Кожа (лат. cutis, гр. derma) је највећи орган људског тела. Чини око 16% укупне телесне масе и код одрасле особе захвата површину од 1,2 - 2,3 m², покривајући целокупну спољашњу површину тела (Anđelković и сар. 2009). Кожа има тежину од око 2 kg и варијабилну дебљину у различитим деловима организма. Најтања је на очним капцима и ушној шкољци, а најдебља на леђима и табанима (Nikolić, 1990; Jurić-Lekić, 2005; 2008).

Интегументарни систем је појам којим су обједињени кожа и њени деривати: длаке, нокти, знојне и лојне жлезде, мукокутани прелази и дојке (Ross, 2011). Кожу чине два, морфолошки и ембриолошки различита, али функционално зависна конституента: **епидерм**, сачињен од кератинизованог сквамозног епитела и **дерм**, сачињен од густог и растреситог везивног ткива, у коме се налазе и нека аднекса коже (корен длаке, знојне и лојне жлезде). Хиподерм (subcutis) је поткожно везивно ткиво, које везује кожу за мишићну или коштану подлогу. Растреситије је од везивног ткива дермиса и садржи различите количине адипозног ткива (Kanitakis, 2002).

Спољашњи слој коже релативно је непропустљив за воду, што онемогућава велики губитак воде испаравањем. Кожа делује као рецепторски орган, штити организам од патогених нокси, токсичних материја, механичког стреса и деловања ултравиолетних зрака (Junqueira и Carneiro, 2005; Proksch и сар. 2008; McLafferty и сар. 2012). Такође, учествује у терморегулацији, екскрецији одређених продуката, синтези витамина D (Arck и Paus 2006; Paus и сар. 2006; Reichrath, 2007). Најзад,

кожа нам помаже да изразимо осећања активношћу вегетативног нервног система (нпр. црвенило условљено вазодилатацијом) (Calonje и сар. 2011).

2.1.1. Епидермис

Епидермис је најповршнији, епителни слој коже. Не садржи крвне судове, па његова исхрана и снабдевање кисеоником у потпуности зависе од дермиса (Јурић-Лекић, 2005). Хистолошки, то је плочасто слојевити епител са израженом кератинизацијом. Овај епител се континуирано обнавља пролиферацијом ћелија базалног слоја, док умрле ћелије опадају са површине (Blanpain и Fuchs, 2006). Током померања ка површини, тј. процеса кератинизације, епителне ћелије мењају облик и фенотипске карактеристике (Koster, 2009).

У зависности од порекла, све ћелије епидерма могу се поделити на кератиноците и некератиноците. Више од 90% епидерма је сачињено од кератиноцита (кератиноцитног система), а остатак чине некератиноцити, ћелије које су имигрирале у епидерм, а другачијег су ембрионалног порекла у односу на кератиноците. У њих спадају: меланоцити (настали од нервног гребена), Лангерхансове ћелије (пореклом од костне сржи) и Меркелове ћелије (воде порекло од нервног гребена) (Naake и сар. 2000; Anđelković и сар. 2009).

2.1.1.1. Слојеви епидермиса

2.1.1.2. Кератиноцити и кератинизација

Идући од дермиса према површини, епидермис се састоји од пет слојева кератиноцита, ћелија које стварају кератин (Junqueira и Carneiro, 2005). Дебљина епидермиса је индивидуална, варира у односу на анатомску локализацију и у распону је од 50 до 100 μm (Sandby-Moller и сар. 2003; Rees, 2004). Сваки слој представља различити стадијум диференцијације у животу епидермних ћелија (Blanpain и Fuchs, 2006).

Stratum basale (Stratum germinativum) је најдубљи слој, митозно активних кератиноцита, од којих потичу остали кератиноцити. Изграђују га кубичне или нискоцилиндричне ћелије, које леже на базалној мембрани, перпендикуларно управљене у односу на њу. Базалне ћелије су хемидезмозомима причвршћене за базалну мембрану, док су међусобно повезане дезмозомима (Green и Simpson, 2007; Bolling и Jonkman, 2009; Sandjeu и Haftek, 2009). Мање су него ћелије у слоју изнад њих и садрже велика еухроматична једра са мало хетерохроматина, као и добро

изражена једарца. Цитоплазма незрих кератиноцита је базофилна због великог броја слободних рибозома (Kanitakis, 2002). Међу ћелијама базалног слоја налазе се ћелије које испољавају пролиферативну способност (стем ћелије и транзит-амплификујуће ћелије), као и постмитозни кератиноцити у G₀ фази ћелијског циклуса који улазе у процес терминалне диференцијације. Транзит-амплификујуће ћелије су ћелије настале асиметричном деобом матичних (стем) ћелија (Jones и сар. 2007). Пролиферативни потенцијал базалних ћелија корелише са експресијом бета 1 интегрин (ITGB1) (engl. integrin, beta 1) (Blanpain и Fuchs, 2006), а познато је да стем ћелије и транзит-амплификујуће ћелије експримишу интегринске молекуле $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ и $\beta 5\beta 1$ (Koster, 2009), γ -катенин (плакоглобин), пролиферативни ћелијски нуклеарни антиген (PCNA) (engl. proliferating cell nuclear antigen) и целуларни маркер пролиферације Ki67 (Kanitakis, 2002). Такође се зна, да су најзаступљенији интегрини епидермиса $\alpha 2\beta 1$ (колагени рецептор), $\alpha \beta 1$ и $\alpha 6\beta 4$ (рецептори за ламинин) (Watt, 2002).

Кератиноцити базалног слоја садрже неуснопљене интермедијарне филаменте, величине 7-9 nm, отпорне на истезање. Кератински филаменти, важна градивна компонента цитоскелета кератиноцита која му обезбеђује структурну издржљивост, састављени су од хетеродимера: молекула кератина 5 (K5-базни тип) и молекула кератина 14 (K14-кисели тип) (Moran и Rowley, 1988; Brown и Burns, 1996; Chu, 2008). Претпоставља се да кератини 5 и 14, као компоненте цитоскелета, обезбеђују ћелијама флексибилност, која им дозвољава да у процесу кератинизације мигрирају из базалног у површинске слојеве. Поред ових изоформи кератина, у базалном слоју запажа се и K19 изоформа, која је уједно и најмањи кератински протеин (Naake и сар. 2000). Поред експресије специфичних хетерополимера кератинских филамената, ћелије базалног слоја експримишу и базонуклин, протеин локализован у једру, чије присуство спречава диференцијацију кератиноцита (Iuchi и Green, 1997). У састав базалног слоја, осим базалних кератиноцита, улазе меланоцити и Меркелове ћелије (Ross, 2011).

Stratum spinosum је смештен изнад базалног слоја и сачињен је од више слојева полигоналних ћелија, ацидофилне цитоплазме, крупних, округлих изразито еухроматичних једара. Ћелије су чврсто повезане међу собом, а место где се спајају продужеци, на светлосном микроскопу изгледа као лако задебљање, тзв. Бизоцеров чвор (Bizzozero). Ово задебљање представља место где се налази дезмозом (Ross, 2011). Супрабазални кератиноцити спинозног слоја, у почетној фази терминалне

диференцијације, полигоналног су облика, базофилне цитоплазме и имају овално еухроматично једро са добро израженим нуклеолусима. Поред кератинских филамената, у цитоплазми се запажају бројни полирибозоми и вакуоле које садрже меланозоме (Kanitakis, 2002). Суперфицијалне ћелије овог слоја, у одмаклој фази диференцијације, плочастог су облика, при чему су им дуже осовине положене паралелно са површином коже. У цитоплазми садрже ламеларне грануле (Одландова тела) (McGrath и сар. 2008; Koster, 2009).

У цитоплазми кератиноцита спинозног слоја доминирају груби снопови кератинских филамената (тонофиламенти), који су посебно изражени у ћелијским продужецима који повезују дезмозоме (Agache и Humbert, 2004). Сваки тонофиламент има пречник од око 10 nm. Уместо комбинације K5-K14 кератинских димера, кератиноцити овог слоја синтетишу K1-K10 (базни тип) кератинске димере (Kanitakis, 2002; Butnaru и Kanitakis, 2002; Kurokawa и сар. 2011), који се запажају већ у супрабазалним кератиноцитима. Ови кератини формирају ригиднији цитоскелет, који ћелијама обезбеђује већу чврстину. У цитоплазми ћелија се налазе и специфичне ламеларне грануле, тзв. кератинозоми, овалног облика и дијаметра од 100 до 400 nm. У овим гранулама су депоновани липиди (церамиди, холестерол), масне киселине, као и ензими (протеазе, киселе фосфатазе, липазе и глукозидазе), а садрже и антимикробни пептид кателицидин (engl. Cathelicidin) (Braff и сар. 2005). Њихов број се повећава у наредном слоју епидерма (Andelković и сар. 2009). У састав спинозног слоја осим кератиноцита улазе и Лангерхансове ћелије (Kanitakis, 2002).

Stratum granulosum је најповршнији слој вијабилног дела епидермиса. Дебљина гранулозног слоја, код нормалне коже, је уопштено пропорционална дебљини орожалог слоја: он је дебео само један до три слоја у подручјима у којима је орожали слој танак, али може да има и до 10 слојева у подручјима са дебелим орожалним слојем, као на кожи дланова и табана (McGrath и сар. 2008). У кератиноцитима овог слоја доминирају кератохијалинске грануле, видљиве и помоћу светлосног микроскопа. Грануле су варијабилног облика и величине до 5 µm, нису ограничене мембраном и садрже филагрин и „омотавајуће“ протеине: лорикрин, кератолинин, панкорнулине и инволукрин. Филагрин везује кератинске филаменте и обезбеђује им чврстину (Li и сар. 1995). Инволукрин, кератохијалин, лорикрин, мали протеини богати пролином (корнифин, SPR1, SPR2) елафин, филагрин и енвоплакин се посредством ензима трансглутаминазе везују за унутрашњу страну плазмалеме, доводећи до њеног задабљања (Naake и сар. 2000; Butnaru и Kanitakis, 2002; Kanitakis,

2002). Неколико часова након задебљања ћелијске опне, кератиноцити овог слоја орожавају, премештајући се у површнији слој епидерма. Сматра се, да у овом стадијуму кератинизације лизозоми ослобађају свој садржај директно у цитосол, лизирајући једро и ћелијске органеле. У овом слоју епидерма престаје синтеза кератинских филамената, а долази до постепеног ослобађања ламеларних гранула (Anđelković и сар. 2009). Када ћелије, у процесу диференцијације, ослободе садржај ламеларних гранула, липиди који су у саставу гранула потпуно попуњавају интерстицијумски простор, формирајући епидермисну баријеру (Cartlidge, 2000; Wertz, 2000).

У здравој кожи, процес терминалне диференцијације је прецизно регулисан и представља равнотежу између пролиферације ћелија базалног слоја и десквамације (Liu и сар. 2009). Базални кератиноцит стиже до рожастог слоја за око 14 дана, а следећих 14 дана је потребно да корнеоцит стигне до површине корнеалног слоја, тако да транзиторно време износи 28 дана (Paravina и сар. 2006).

Stratum lucidum се сматра подслојем корнеалног слоја и налази се само код дебеле, глатко-палмо-плантарне коже (Calonje и сар. 2011). Састоји се од спљоштених, еозинофилних ћелија које немају једра, док се у цитоплазми првенствено налазе густо спаковани филаменти у матриксу који је назван елеиден. Једро и органеле нестају како ћелија постепено кератинизује. Овај слој разликује се хистолошки од остатка рожнатог слоја, по томе што је богат липидима везаним за протеине, садржаним у Одландовим телима. Коначно, терминална диференцијација резултира формирањем кератиноцита, ћелија које су изгубиле једро и цитоплазматске органеле, тзв. корнеоцита (Koster, 2009). Ово се дешава под утицајем неколико различитих ензима деградације, који су идентификовани у грануларним ћелијама. Морфолошке и биохемијске промене једра су карактеристичне за апоптотску форму ћелијске смрти, укључујући интернуклеозомалну фрагментацију DNK и активацију каспаза, иако друге морфолошке особине апоптозе нису видљиве (Haake и сар. 2000).

Stratum corneum (рожасти слој) је коначни производ епидермалне диференцијације. Састоји се од 15 до 25 слојева, густо пакованих (Ya-Xian и сар. 1999), спљоштених, ануклеусних, кератинизованих, сквамозних ћелија-корнеоцита, чија је цитоплазма испуњена филаментозним склеропротеином, кератином (Holbrook и Odland, 1974; Brody, 1977; Tagami, 2008). Овај динамички и метаболички интерактивни слој епидермиса (Elias, 1996), садржи око 60% структурних протеина, 20% воде и 20% липида (Mathias и Maibach, 1982; Jackson и сар. 1993). Дебљина

корнеалног слоја креће се у распону од 10 до 25 μm (Agache и Humbert, 2004). Корнеоцити се преклапају на својим ивицама и узубљују са околним слојевима наборима, браздама и микровилима. Интерцелуларни простор тј. размак између суседних корнеоцита износи око 0,1 до 0,3 μm (Plewig, 1970). Дезмозоми, означени и као корнеозоми, представљају посебне међукорнеоцитне везе, сачињене од протеина који заједно са липидима одржавају интегритет *Stratum corneum*-а (Rawlings и сар. 1994). У дубљим деловима овог слоја, плазмалема орожалих, кератинизованих ћелија је задебљала и покривена гликолипидима који су главни конституент водене баријере епидермиса. Такође, она је код корнеоцита дебља (20-25 nm) у односу на плазмалеме кератиноцита нижих слојева (8-9 nm), што је последица таложења густе маргиналне траке сачињене од инволукрина (Strott и Higashi 2003). За време кератинизације хидролитички ензими лизозома уклањају цитоплазматске органеле, па унутрашњост корнеоцита нема једро и мембранске органеле, а садржи само густе зраке кератинских филамената уроњених у аморфни, интерфиламентозни матрикс. Десквamacија спољашњих слојева корнеалног слоја укључује губљење међућелијских веза (дезмозома и интерцелуларних супстанци), што је вероватно условљено ензимском активношћу (Menon и сар. 2012) и учешћу холестерол сулфатаза које модификују липиде (Strott и Higashi 2003). На овај начин десквамује тзв. „меки“ кератин (Naake и сар. 2000), што резултује обнављањем рожастог слоја (Lalević-Vasić и сар. 2008).

Потпуно претварање ћелија гранулозног слоја у корнеоците прати губитак од 45-86% масе ћелија (Holbrook и Wolff, 1993). Основна функција овог слоја је пружање механичке заштите коже и стварање баријере која спречава губитак воде из коже, као и прелазак растворљивих материја из околине у кожу (Elias, 2005). Корнеални слој представља и баријеру против агресивних патогена (Marks, 2004). Обољења или генски дефекти који ремете правилно формирање и функцију ове баријере, имају за последицу озбиљне поремећаје хомеостазе коже, а самим тим и функционисања читавог организма (Ramos-E-Silva, 2012).

2.1.1.3. Меланоцити и меланогенеза

Меланоцити су некератиноцити дендритског изгледа. Распоређени су између базалних кератиноцита и имају способност продукције заштитног пигмента меланина. Меланоцити чине око 8% ћелија епидермиса (Marks и Seabra, 2001). У току ембрионалног развоја са кератиноцитима остварују специфичне функционалне асоцијације, формирањем тзв. епидермно-меланинских јединица, у којима један меланоцит остварује контакте са око 36 кератиноцита и снабдева их меланином

(Anđelković и сар. 2009). Овај однос варира у зависности од региона тела, али просечно на сваких 4 до 10 базалних кератиноцита долази по један меланоцит. Густина меланоцита зависи и од изложености ултравиолетном зрачењу, а може бити у односу на кератиноците 1:4 до 1:30 (Ulger и сар. 2003). Број зрелих меланоцита по јединичној површини коже је приближно једнак код људи различите боје коже, а варијације постоје у односу на локализацију- 2000 меланоцита по mm^2 коже главе и подлактице и 1000 меланоцита по mm^2 осталог дела тела (Costin и Hearing, 2007). Зреле ћелије се ретко деле, будући да живе годинама, чак и деценијама (Anđelković и сар. 2009). Наиме, митозна активност меланоцита у фотонеекспонираној кожи одраслих особа готово је 30 пута мања, него митозна активност кератиноцита. Излагање коже UV зрачењу у извесној мери повећава број митоза, али је далеко значајнији ефекат овог зрачења на меланогенезу. Неки аутори сматрају да меланоцити не пролиферишу *in situ* и да је број меланоцита који функционише у епидермису константан, али и да се смањује са старењем (Nordlund и сар. 1998; Naake и Holbrook, 1999; Jimbow и сар. 1999).

Меланоцити не стварају дезмозомске везе са кератиноцитима и не крећу са њима ка површини епидерма. За базалну ламину причвршћени су везама налик на хемидезмозоме (тзв. густе плоче). У цитоплазми садрже интермедијарне филаменте сачињене од виментина и иако се на хематоксилин-еозин (HE) бојењу разликују од кератиноцита по тамнијем дугуљастом једру и светлијој цитоплазми, меланоцити се могу поуздано идентификовати једино употребом специјалних бојења (нпр. Masson-Fontana бојење или DOPA реакција) (Anđelković и сар. 2009). За њихову идентификацију може се користити и S-100 протеин (Petersson и сар. 2009), који није специфичан маркер меланоцита јер у епителима маркира и Лангерхансове ћелије (Wilson и сар. 1991).

Основна карактеристика меланоцита је присуство бројних меланозома, органела сличних лизозомима, који садрже пигмент меланин (Ackerman и сар. 1997; Naake и Holbrook, 1999; Bolognia и Orlow, 2003). Меланин се јавља у две форме-као еумеланин (смеђе боје), који је фотопротектор, сакупљач слободних радикала и фео-меланин (жуте до црвене боје) који је фотосензитер, потенцијално фототоксичан, генератор слободних радикала који оштећују DNK (Marks, 1992; Kadarko и сар. 2003). Пигмент меланин је великим делом одговоран за боју коже, чиме штити ткива коже од ултравиолетног зрачења (Lin и Fisher, 2007).

UV зрачење, заједно с инфрацрвеним и видљивим зрачењем чини спектар Сунчевог зрачења. Ови електромагнетни зраци обухватају таласне дужине (λ) између 200 и 400 nm. Деле се на: UV-C (λ 220-290 nm), UV-B (λ 290-320 nm) и UV-A (λ 320-400 nm). Зраци краће таласне дужине садрже већу количину енергије и потентнији су за оштећења биомолекула, док зраци веће λ имају мање енергије и пенетрирају у дубље структуре (Pfeifer и сар. 2005).

Тамна кожа, садржи више еумеланина и боље је заштићена од UV зрачења у односу на белу кожу. Gloster и Neal (2006) наводе да меланин у кожи људи црне расе представља два пута ефикаснију заштиту од UVB зрачења, у односу на меланин у кожи људи беле расе. Такође се зна, да епидермис коже припадника црне расе пропушта свега 7,4% UVB и 17,5% UVA зрачења, а епидермис коже припадника беле расе 24% UVB и 55% UVA зрачења (Halder и Bridgman-Shan, 1995).

Меланин се продукује оксидацијом тирозина у 3,4-дихидроксифенилаланин (DOPA) помоћу тирозиназе и каснијом трансформацијом DOPA у меланин. Ове реакције иницијално се дешавају у премеланозомима. Меланински прекурсори и интермедијарни продукти биосинтезе, као што су феноли, индоли и хинони, су јаки оксидујући реагенти који могу да угрозе друге ћелијске структуре меланоцита, па је синтеза меланина затворена у меланозомима, у којима је сама реакција, као и њени продукти, безопасна (Jimbow и сар. 1986; Raposo и сар. 2001; Raposo и Marks, 2002; Bolognia и Orlow, 2003). Након синтезе меланина, меланозомским транспортом, који може бити двосмеран, меланозоми се крећу ка процесусима. На дендритским крајевима, меланозоми се везују за актинске филаменте у циљу спречавања њиховог ретроградног транспорта, као и омогућавања трансфера у суседне кератиноците. Кретање тј. причвршћивање меланозома дуж актинских филамената остварује се уз помоћ посебног транспортног система (миозина Va, мембранског протеина Rab27a и меланофилина). Ретроградно кретање ка минус крају микротубула, које се налази у центру ћелије, посредовано је цитоплазматским динеином, који хвата свој терет помоћу динактина (Nordlund и сар. 1998; Wu и сар. 2001; Seabra и Barral, 2004).

Кератиноцити фагоцитују меланоцитне процесусе у којима су зрели меланозоми, испуњени синтетисаним меланином (Hara и сар. 2000; Vancouillie и сар. 2000), а меланинске грануле се затим акумулирају у супрануклеусном региону цитоплазме кератиноцита. Ова супрануклеусна меланинска капа ефикасно апсорбује и расипа UV зрачење и на тај начин штити једро кератиноцита од мутагених оштећења (Boissy, 2003; Byers и сар. 2003; Yamashita и сар. 2005; Van Den Bossche и

сар. 2006). Меланозоми коже припадника црне расе су отпорнији на деловање ензима лизосома, остају интактни кроз епидермалне слојеве кератиноцита и граде ефикасну супрануклеусну баријеру. За разлику од црне коже, меланозоми особа светле пути се лако деградирају, па њихова презентација у виду „меланинске прашине“ у супрабазалном слоју епидермиса, не пружа значајнију заштиту од UV зрачења. Редукција меланозома у горњим слојевима епидермиса, представља значајан фактор карциногенезе (Brenner и Hearing 2008).

Многобројни хормони, цитокини и фактори раста делују на пролиферацију меланоцита и меланогенезу. Зна се да мелано-стимулишући хормон α (α -MSH), β -ендорфин, адренално-кортикотропни хормон (АКТН), естроген и прогестерон стимулишу пигментацију путем повећања cAMP и тирозиназне активности (Kausar и сар. 2003). На молекулском нивоу, излагање UV зрацима појачава пигментацију коже везањем α -MSH за меланокортни рецептор 1 (MC1R), при чему долази до преноса сигнала у ћелију и појачане изражености ензима кључних у производњи меланина. Особе светле пути често имају полиморфизме гена MC1R, а тиме и смањену активност самог MC1R (Frandsberg и сар. 1998). Новооткривена молекулска веза између оштећења DNK и тамњења, путем p53/MC1R сигналног пута, јасно показује да је последица намерног тамњења, било којим извором UV зрака, трајно оштећење DNK (Miller и Tsao, 2010).

И сами кератиноцити производе специфичне факторе који делују на пролиферацију меланоцита и одређују однос еумеланина и феомеланина у синтетисаном пигменту (Duval и сар. 2001; 2002).

Меланинска пигментација је основ конституцијске и факултативне боје коже. Конституцијска боја коже представља еволуцијски механизам заштите од Сунчевих зрака и последица је базалне синтезе меланина, без утицаја Сунчеве светлости. Факултативна (индуцибилна) пигментација настаје после излагања коже UV зрацима и деловањем хормона који стимулишу меланоците (Brenner и Hearing 2008).

UV зраци подстичу синтезу еумеланина, не утичући значајније на продукцију феомеланина. Експериментима на мишевима установљено је да UV зрачење повећава меланогенезу и број диферентованих меланоцита у кожи. Такође је утврђено да UV зраци стимулишу меланогенезу и смањују пролиферацију култивисаних хуманих меланоцита. Поред стимулације меланогенезе, UV зраци оштећују меланоците и то изразитије ћелије са мањим садржајем меланина (Kochavar и сар. 1999; Astner и Anderson, 2004).

Поред епидермиса, меланоцити се могу наћи у фоликулу длаке, између матриксних ћелија, као и у појединим регионима дерма. Најбројнији су на местима где везивно ткиво испољава одређен степен пигментације. Меланоцити дерма имају звездаст облик, дугачке продужетке и дугуљасто једро (Andelković и сар. 2009).

Меланоцити продукују различите цитокине који могу бити посредници у дермалној и епидермалној инфламацији. Они могу да експримују интерлеукине: IL-1, IL-3, IL-6 и IL-8, моноцитно-хемотактички протеин-1 (MCP-1), гранулоцитно-макрофагно стимулишући фактора раста колонија (GM-CSF), фактор некрозе тумора α (TNF- α) и трансформишући фактор раста β (TGF- β) (Kondo, 2000; Agar и Young, 2005).

2.1.1.4. Лангерхансове ћелије

Лангерхансове ћелије (ЛЋ) су незреле дендритичне ћелије, пореклом од матичних ћелија костне сржи. Директни прекурсори ЛЋ у крви, налазе се међу ћелијама које исказују CD34 мембрански маркер и поседују кутани LA антиген. Процес диференцијације CD34+ ћелија у Лангерхансове ћелије покреће фактор трансформације раста бета 1 (TGF- β 1) (Riedl и сар. 2000б).

ЛЋ настањују епител коже, усне дупље (Daniels, 1984; Barrett и сар. 1996), једњака (Yassin и Toner, 1976), вагине (Iijima и сар. 2007) и коњуктиве и чине 2-8% интраепителних ћелија (Séaguiер и сар. 2000). Тело човека је прекривено мрежом која садржи око 2×10^9 ЛЋ (Romani и сар. 2006), релативно су хомогено распоређене и њихова густина у кожи, уз регионална варирања, износи 460-1000 ћелија/mm² (Schuler, 1990), осим на длановима и табанима који су лишени ЛЋ (Lipozenčić и Ljubojević, 2004). Иако их има релативно мало, њихова дендритична природа и способност да мигрирају омогућава им успостављање контакта са више кератиноцита. Формирањем „стабилно покретне мреже“ овим ћелијама омогућен је надзор целог епидерма и могућност реаговања на спољашње подстицаје (Schuler, 1990). У склопу имунског система ЛЋ имају улогу „стражара“ и зато се налазе на истуреним положајима, односно на граници између спољашње и унутрашње средине (Stingl и сар. 1977).

У слојевитим епителима ЛЋ заузимају супрабазални положај, при чему је њихово повезивање са кератиноцитима окружења, делимично посредовано Е-кадхеринима, као и другим молекулима адхезије, попут клаудина (Zimmerli и Hauser, 2007). Везе између кератиноцита и ЛЋ нису стабилне, већ динамичне, јер се кератиноцити, у процесу кератинизације, стално померају ка површини (Merad и сар.

2002; Kanitakis и сар. 2011). Чињеница да ЛТћ и њихови епидермни симбионти формирају функционалну јединицу, не значи да ЛТћ имају улогу у епидермалној хомеостазу. Показано је да епидермис без ЛТћ код DTR нокин (engl. DTR knockin) мишева не показује промене (Kissenpfennig и сар. 2005) и да нема абнормалности у епидермалној структури коже мишева која не поседују епидермалне ЛТћ од рођења (Kaplan и сар. 2005).

ЛТћ експримују Fc, IgG и C3 рецепторе (Stingl и сар. 1977), CD1a антиген са изотиповима CD1a i CD1c (Fithian и сар. 1981; Murphy и сар. 1981; Harrist и сар. 1983) и МНС молекуле класе II (Klareskog и сар. 1977; Rowden и сар. 1977; Sontheimer и сар. 1986; Walsh и сар. 1990). Лангерхансове ћелије исказују мембранске молекуле карактеристичне и за лимфоците (лимфоцитни функционални антигени LFA-3; CD58), и за ћелије моноцитно/макрофагне серије. На овим ћелијама детектују се панхематопоезни антиген CD45, површински S-100 протеин (Wilson и сар. 1991), виментински филаменти који указују на мезенхимско порекло Лангерхансових ћелија (Fujita и сар. 1991) и Langerin (CD207) у Бирбековим (Birbeck) гранулама (Valladeau и сар. 2000). На Лангерхансовим ћелијама запажа се различита експресија интрацелуларних адхезивних молекула (ICAM-1; CD54) који омогућавају адхезију, миграцију и друге аспекте имунске функције ових ћелија (Lotze и Thomson, 2001).

За њихову идентификацију у људским епителима најчешће се користе анти-CD1a моноклонска антитела (DiFranco и сар. 1985; Reibel и сар. 1985; Newcomb и Powell, 1986; Juhl и сар. 1988; Hitzig и сар. 1989; Pitigala-Arachchi и сар. 1989).

Кретање ЛТћ је предуслов за њихову способност везивања антигена. ЛТћ својим дендритима продире кроз уске спојеве кератиноцита и прикупљају антигене или патогене који су прошли баријеру корнеалног слоја (Kubo и сар. 2009). Оне имају јако изражену способност препознавања, хватања и преузимања антигена (Andelković и сар. 2009). Интраепидермално кретање ЛТћ је визуализовано (Kissenpfennig и сар. 2005; Vishwanath и сар. 2006) али молекуларни догађаји који регулишу овај процес су још увек недовољно разјашњени. Неки аутори указују на важну улогу трансформишућег фактора раста α (TGF- α), који је од суштинског значаја за експресију Е-кадхерина, молекула адхезије који експримују ЛТћ и који им омогућава да бораве у епителу. Након интеракције ЛТћ са антигенима, долази до ослобађања инфламаторних медијатора и смањења нивоа Е-кадхерина, што омогућава потенцијалну миграцију ЛТћ из епитела (Riedl и сар. 2000a). Е-кадхерин олакшава интеракцију ЛТћ са кератиноцитима и спречава њихово спонтано сазревање (Allam и

сар. 2003). Такође се наводи да је и TGF- β од суштинског значаја за експресију Е-кадхерина код хуманих и мишјих ЛТ (Riedl и сар. 2000 б).

Када ЛТ вежу антигене у епидермису, оне лимфним судовима дерма континуирано напуштају кожу, док нове ЛТ попуњавају епидермис (Stoitzner и сар. 2002). Средње време боравка ЛТ у људској кожи је 3 недеље (Teunissen, 1992). На путу до лимфних чворова оне врше протеолитичку деградацију антигена на кратке пептиде, које затим везују за МНС II молекуле и излажу на површини (Inaba и Inaba, 2005). Како одмиче процес обраде антигеног материјала, тако се на плазмалеми Лангерхансових ћелија повећава ниво експресије МНС II и костимулаторних молекула и на тај начин ЛТ постепено сазревају (Andelković и сар. 2009). У нормалној кожи, епидермис се самопопуњава ЛТ (Merad и сар. 2002), али у запаљенским стањима ЛТ напуштају кожу у великом броју, те је неопходно њихово допуњавање крвним прекурсорима, највероватније моноцитима (Ginhoux и сар. 2006).

ЛТ су једине ћелије у нормалном епидермису које имају аденозинтрифосфатазну активност (АТФ-аза +)(Wolff и Winkelmann, 1967).

Цитокини које луче ЛТ, као што су IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 и IL-18 играју важну улогу у регулисању имунске реакције (Hochrein и сар. 2001). Sauder и сар. (1984) су открили да 97% ЛТ продукује IL-1, који промовише лимфоцитну хемотаксу и активацију фактора активације лимфоцита (LAF) (engl. lymphocyte activating factor), као и IL-2, IL-3 и интерферон γ (IFN- γ) (Bennett и сар. 2007). Познато је да је IL-15 обично изражен у нормалној људској кожи код активираних фибробласта, кератиноцита и у ЛТ (Mollah и сар. 2002).

Различити физички и хемијски агенси (UV и јонизујуће зрачење, кортикостероиди, хемијски канцерогени) доводе до смањења густине Лангерхансових ћелија. Изгледа да је поремећај баријерне функције значајан фактор који утиче на густину ових ћелија у кожи. Верује се, да функционална оштећења ЛТ коже повећавају подложност за развој тумора, након излагања канцерогенима, UV зрачењу, или онкогеним вирусима (Vicari и сар. 2004), као и да ЛТ доприносе имунолошкој заштити од тумора, директним лучењем цитокина са антитуморском активношћу и побуђивањем системског имунског одговора (Lotze и Thomson, 2001; Vicari и сар. 2004). Вероватно је основни механизам у овом збивању, експанзија регулаторних Т ћелија, посредована ЛТ (Kautz-Neu и сар. 2011). Ова улога ЛТ је већ раније уочена, а показано је да зависи од транскрипционог фактора NF- κ B (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) лиганда који продукују суседни кератиноцити

(Loser и сар. 2006). То такође може објаснити запажену Т-регулаторну индукцију од стране ЛТ_h, у имуносупресији насталој под утицајем UVB зрачења (Schwarz и сар. 2010).

Иако се за ЛТ_h зна више од 140 година, још увек представљају једну од „најтајанственијих“ врста ћелија, чија функција није прецизно дефинисана. Наиме, научници су генетски модификованим мишевима којима су деплетирани ЛТ_h апликовали хаптен и утврдили следеће контрадикторне резултате: контактна хиперсензитивна реакција била је ослабљена (Bennett и сар. 2005), појачана (Kaplan и сар. 2005) и непромењена (Kissenpfennig и сар. 2005). Ипак се са сигурношћу зна, да је једна од функција ЛТ_h одржавање баланса између имунитета и периферне толеранције (Mathers и Larregina, 2006).

2.1.1.5. Меркелове ћелије

Меркелове ћелије представљају сензорне механорецепторе, али се претпоставља да припадају и дифузном неуроендокрином систему (Junqueira и Carneiro, 2005; Calonje и сар. 2011). Ове ћелије нису присутне у свим регијама епидерма, већ у специјалним регионима као што су усне, фоликули длака (Paravina и сар. 2006) дебела кожа дланова и табана, нокатне плоче, гениталије (Јурић-Лекић, 2005). Помало личе на епителне ћелије епидермиса, али садрже мале тамне грануле у својој цитоплазми (Junqueira и Carneiro, 2005). У гранулама се налазе бројни пептиди, као што су метенкефалин, вазоактивни интестинални пептид (VIP), хромогранин А, неурон специфична енолаза (NSE) и синаптофизин. Меркелове ћелије садрже и кератинске филаменте, а помоћу дезмозома повезане су са кератиноцитима (Paravina и сар. 2006). Слободни нервни завршеци на бази Меркелових ћелија формирају проширени терминални диск (Junqueira и Carneiro, 2005).

2.1.2. Дермно-епидермни спој (зона базалне мембране)

Епидермис је чврсто повезан са дермисом помоћу дермно-епидермног споја, односно базалном мембраном (Bolling и Jonkman, 2009). Дермно-епидермни спој је врло нераван, чиме се повећава површина кроз коју дифузијом пролазе хранљиве материје и кисеоник, потребни за метаболизам епидермиса (Јурић-Лекић, 2005). Епидерм се увлачи у дерм преко епидермних гребена, а дерм у епидерм шаље прстолике дермне папиле (Andelković и сар. 2009). Главни градивни елементи базалне мембране су колаген тип IV, ламинин, хепарин-сулфат и ентактин, које секретују

мезенхимске и епидермалне ћелије (Ко и Marinkovich, 2010). Такође, базална мембрана садржи и екстрацелуларне крајеве трансмембранских протеина-интегрина, протеогликан перлакан и гликопротеин фибронектин (Anđelković и сар. 2009). Иако је главна функција базалне мембране везивање ћелија епидермиса за испод лежећи дермис, интеракција базалне мембране и епителних ћелија важна је за пролиферацију, кретање и диференцијацију ћелија. Зону базалне мембране чини плазмалема базалних кератиноцита са хемидезмозомима, базална ламина са своја два слоја (*lamina lucida* и *lamina densa*) и ламина фиброретикуларис, која повезује базалну ламину са везивним ткивом дермиса, посредством фибронектина, микрофиламената и усидравајућих филамената, изграђених од колагена тип VII (Odland, 1991; Paravina и сар. 2006; Breitkreutz и сар. 2009). На светлосном микроскопу, базална ламина и ламина фиброретикуларис виде се као базална мембрана (Merker, 1994), нарочито на препаратима бојеним PAS-техником (Anđelković и сар. 2009). Са старењем долази до стањивања епидермиса, повлачењем епидермних гребенова (пречки) из дермиса. Ово доводи и до заравњивања епидермно-дермне границе, додирне површине између епидермиса и дермиса (Хертел, 2000). Такође, дуготрајна експозиција коже UVA зрачењу доводи до заравњења дермно-епидермног споја, са губитком епидермних пречки и задебљања ламине дензе (Gilchrest и сар. 1996; Bernerd, 2005).

2.1.3. Дермис

Дермис је васкуларизована, везивно-ткивна компонента коже која даје потпору епидермису и повезује га са поткожним ткивом. У њему се налазе епидермална аднекса, нерви, крвни и лимфни судови. Везивно ткиво дерма је сачињено од: ћелија (фибробласти, фиброцити, мастоцити, макрофаги, Лангерхансове ћелије, леукоцити) и ванћелијског матрикса (екстрацелуларни матрикс- ЕЦМ) (McGrath и сар. 2008). На основу разлике у густини и распореду везивног ткива, унутар дермиса се разликују два слоја која нису јасно ограничена. То су спољашњи, ужи, папиларни дерм и унутрашњи, шири, ретикуларни дерм (Paravina и сар. 2006).

Папиларни дермис је приближно два пута дебљи од епидермиса и садржи мање колагених фибрила и окситаланских еластичних влакана, али више матрикса. Танка колагена и еластична влакна су неуређеног распореда, са већим уделом управно (под правим углом) орјентисаних влакана. Он садржи мале крвне судове, претежно капиларе, нервне гранчице и нервне завршетке (McGrath и сар. 2008). Структурне

карактеристике матрикса у папиларном слоју дермиса омогућавају кожи да се прилагоди механичком стресу. Папиларни слој обезбеђује исхрану епидермиса и учествује у регулацији телесне температуре, преко капиларних плексуса. Ћелије овог слоја стварају велике количине протеогликана (Kanitakis, 2002).

Ретикуларни дермис, чини већи део дерма и примарно се састоји од колагених фибрила великог пречника, организованих у велике, испреплетане сплетове који се укрштају са зрелим, тракастим, разгранатим еластичним влакнима (McGrath и сар. 2008). Ова два система влакана су интегрисана, чиме се обезбеђује отпорност дермиса на механички стрес. Такође, ова влакна пружају потпору другим компонентама коже, као што су длачни фоликули, знојне и лојне жлезде (Baker и сар. 1989). Унутар овог ткива налазе се крупнији крвни судови, лимфатици и нерви коже (McGrath и сар. 2008).

2.1.3.1. Ћелије дермиса

2.1.3.1.1. Фибробласти

Фибробласти су доминантна, есенцијална ћелијска популација дерма, која настаје диференцијацијом примитивних мезенхимских ћелија (Paravina и сар. 2006; McGrath и сар. 2008). Они имају важну улогу у развоју, одржавању нормалне функције и организације екстрацелуларног матрикса дермиса, регенерацији везивних влакана, као и комуникацији са осталим ћелијама (Шехтер и Берченко, 1978; Байрейтер и сар. 1995; Kahari и Saarialho-Kere, 1997; Stephens и Genever, 2007).

Дермни фибробласти представљају фенотипски хетерогену ћелијску популацију (Sorrell и Caplan, 2004; Nolte и сар. 2008), која се како *in vivo*, тако и *in vitro* разликује по морфологији, молекуларно-генетским карактеристикама, пролиферативном потенцијалу, степену диференцијације као и у продукцији компоненти међућелијског матрикса и фактора раста/цитокина (Young и сар. 2001). У дерму се налазе три субпопулације фибробласта од којих су две локализоване у папиларном и ретикуларном слоју дерма, док је трећа субпопулација фибробласта повезана са длачним фоликулима (Jahoda и Reynolds, 1996). Претпоставља се да је разноврсност фибробласта дерма, условљена деловањем више фактора и учешћем гена породице AP-1, homeobox гена, регулатора ових гена, а такође и утицајима суседног епидерма (Sorrell и Caplan, 2004).

Хетерогеност фибробласта условљена је и њиховим местом у фибробластној диференцијацији. Наиме, Шехтер и Берченко (1978) су на основу ултраструктурних карактеристика поделили фибробласте на 6 типова. Према њима

„малодиферентовани“ и „млади“ представљају незреле форме фибробласта, а четири типа: „колагенобласти“, „миофибробласти“, „фибробласти“ и „фиброцити“, зреле диферентоване форме фибробласта.

У дерму човека издвајају се и две велике ћелијске популације фибробласта, тзв. митотски активни фибробласти (МФ) и постмитотски фибробласти (ПМФ) (Байрейтер и сар. 1995; Nolte и сар. 2008). Саопштено је да се митотски активни фибробласти у односу на пролиферативни потенцијал и способност синтезе TGF- β и фактора раста кератиноцита (KGF), даље деле на 3 субпопулације: МФ I, МФ II и МФ III (Nolte и сар. 2008).

Имунофенотипске карактеристике фибробласта омогућавају одређивање њихових антигених профила и јављају се у ћелијама како *in vivo*, тако и *in vitro*. Дермни фибробласти се карактеришу експресијом мезенхимских маркера (CD90, CD73, CD105, CD44, виментин) и одсуством епителних, хемопоезних и ендотелних маркера (Sorrell и Caplan 2009; Бозо и сар. 2010). Имунофенотипска карактеристика дермних фибробласта је и експресија протеина међућелијског матрикса-фибронектина, еластина, колагена тип I, III, IV и V (Бозо и сар. 2010). Без обзира на то што фибробласти дерма експримују више различитих ћелијских антигена, ни један од њих није ексклузивни маркер за ову ћелијску популацију. Данас се за два маркера, протеин FSP1 (члан породице протеина S100) и протеин FAP (протеин активације фибробласта) сматра да представљају најспецифичније маркере за идентификацију фибробласта (Strutz и сар. 1995; Kalluri и сар. 2006; Covas и сар. 2008; Sorrell и Caplan 2009), али и они нису искључиви (ексклузивни) маркери фибробласта.

Основна функција фибробласта коже је продукција, организација и обнављање међућелијског матрикса, регулација процеса запаљења, учешће у зарастању рана, комуникација са осталим ћелијама и регулација диференцијације епидермиса (Tomasek и сар. 2002; Sorrell и сар. 2004; Parsonage и сар. 2005). Дермни фибробласти синтетишу основне компоненте међућелијске супстанце, а синтетишући и организујући колагена и еластична влакна, гликопротеине и протеогликане, подржавају механичку функцију коже (Шехтер и Берченко, 1978; Байрейтер и сар. 1995; Kahari и Saarialho-Kere, 1997; Stephens и Genever, 2007). Такође, као важан извор металопроотеиназа матрикса (MMPs), које разграђују компоненте ванћелијског матрикса, фибробласти регулишу његово самообнављање и обезбеђују хомеостазу (Kalluri и сар. 2006). Важно је истаћи да дермни фибробласти учествују у синтези инфламаторних медијатора, њихових рецептора и антагониста (Zorina, 2011).

Продукујући факторе раста, као што су кератиноцитни фактор раста 1 (KGF-1), GM-CSF, IL-6, IL-8, и непосредно делујући на епителне ћелије, фибробласти играју кључну улогу у регулацији епидермалне морфогенезе. Продукцијом колагена тип IV и ламинина, фибробласти утичу на формирање базалне мембране (Chang и сар. 2002; Lee и Cho, 2005; Marionnet и сар. 2006). Производња сигналних молекула утиче на пропустљивост васкуларних зидова и метаболизам, чиме се остварује трофичка функција. Дермни фибробласти активно учествују у ангиогенези. Продукују мноштво проангиогених фактора и то: васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF) (engl. vascular endotelial growth factor), фибробластни фактор раста (FGF) (engl. fibroblast growth factor), TGF- β 1, хепатоцитни фактор раста (HGF/SF) (engl. Hepatocyte growth factor/scatter factor) и ангиопоетин-1, који индукују диференцијацију и миграцију ендотелних ћелија и доприносе формирању и стабилизацији крвних судова (Sorrel и сар. 2003; Sorrell и Caplan 2009). Фибробласти имају важну улогу у имунитету коже. Korn је 1981. показао инхибирајуће деловање фибробласта на митогенезу и пролиферацију Т-ћелија (Korn и сар. 1981). Фибробласти синтетишу више кључних посредника запаљења, међу којима је и фактор транскрипције RelB, једровог фактора kB, породице NF-kB и имају ефекат на активирање мастоцита (Hogaboam и сар. 1998). Фибробласти коже узимају учешће и у неуроендокриној регулацији. Они су способни да синтетишу биолошки активне пептиде и експримују рецепторе за андрогене и естроген, преко којих се остварује утицај ових хормона на кожу човека (Perić и сар. 2011).

При хроностарењу се мења број, морфологија, пролиферативни потенцијал и функционална активност фибробласта (Fisher и сар. 2002; Varani и сар. 2006; Fisher и сар. 2008; Sorrell и Caplan, 2009), док деловањем UV зрака, при фотостарењу, пре свега „страда“ биосинтетска функција ових ћелија (Jenkins, 2002).

2.1.3.1.2. Мастоцити

Мастоцити су лутајуће ћелије везивног ткива које луче примарне и секундарне медијаторе запаљења (Andelković и сар. 2009). Развијају се из CD34⁺ прекурсорских ћелија костне сржи (Walsh, 2003), које се диферентују и сазревају у периферним ткивима (Puxeddu и сар. 2003). Присуство стем ћелијског фактора (SCF), интерлеукина IL-3, IL-4 и IL-9 значајно је за детерминацију крајњег фенотипа зрелих мастоцита (Galli и Tsai, 2008). Зреле ћелије присутне су у везивном ткиву, у различитим регионима тела, а нарочито су концентрисане у близини крвних судова, нерава и испод епитела, чинећи при том око 10% популације везивноткивних ћелија

(Anđelković и сар. 2009). Овакав стратешки распоред мастоцита сугерише на њихову важну улогу у заштити од инфилтрације патогена и токсина (Metz и сар. 2006), као и деловања UV зрачења (Grimbaldeston и сар. 2006). У кожи су мастоцити првенствено локализовани у горњем дерму, близу крвних судова, нервних завршетака и аднекса коже са просечном густином од око 7000 ћелија/mm³ (Weber и сар. 1995; Hide и сар. 2007).

Мастоцити су овалне или округле ћелије, промера 10-13 μm , чија је цитоплазма испуњена базофилним секреторним гранулама, које често прекривају мало, округло јдро смештено у центру ћелије (Junqueira и Carneiro, 2005). Морфологија ћелије зависи не само од биолошке врсте (човек, глодар), већ и од топографске локализације унутар истог организма (Anđelković и сар. 2009). И поред сличне морфолошке грађе разликују се две субпопулације. Једну чине мастоцити везивног ткива, а другу мастоцити мукозе (Junqueira и Carneiro, 2005).

Хумани мастоцити се на основу садржаја неутралних серин протеаза, које се налазе у гранулама, деле на MC^T и MC^{TC} мастоците. MC^{TC} тип у својим гранулама садржи триптазе, химазе, карбоксипептидазе и протеазе сличне катепсину G и налазе се првенствено у дерму, синовији и интестиналној субмукози (Irani и сар. 1991). Мастоцити типа (MC^T) од неутралних протеаза садрже искључиво триптазе (Irani и сар. 1989), а нађени су првенствено у слuzници црева и у зиду алвеола. Трећа група мастоцита, тип MMC, богата је у химазама, а релативно оскудна у триптазама. Овај тип мастоцита је присутан у интестиналној субмукози, али се у малом броју може наћи у кожи, лимфним чворовима, плућним алвеолама и цревној мукози (Weidner и Austen, 1993). Мастоцити имају изражену фенотипску хетерогеност и разликују се по садржају површинских рецептора, профилу цитокина које продукују, способности интеракције са компонентама ванћелијског матрикса, одговору на физиолошке и патолошке стимулусе и реакцији на алергене (Malaviya и Abraham, 1998). Ипак, претпоставља се да су сви мастоцити у стању да врше фагоцитозу, прерађују протеински садржај и презентују антигене Т-лимфоцитима, без обзира на исказане различите карактеристике (Abraham и Malaviya, 2000; Henz и сар. 2001).

Мастоцити су ефекторне ћелије важне за индукцију инфламаторног одговора (Maurer и сар. 2006). Активација мастоцита дешава се под утицајем неспецифичних (трауме, физички напор, топлота, хладноћа, зрачење) или специфичних (токсини, алергени, неки медикаменти) стимулуса (Anđelković и сар. 2009). Мастоцити се активишу бројним имунским и неимунским стимулусима, као што су сигнализација

преко Fc γ рецептора за IgG, потом активација преко цитокина, хемокина, ендогених и егзогених пептида, хемијских и физичких стимулуса (Gilfillan и Tkaczyk, 2006; Galli и сар. 2005а; Galli и сар. 2005б). Ипак, најбоље је проучен механизам „алергијске активације“ преко површинских рецептора за имуноглобулин Е (IgE) (Rivera и Gilfillan, 2006).

Ефекторна функција мастоцита заснована је на продукцији и секрецији биогених амина, протеина, протеогликана, липидних медијатора и цитокина (Norris, 2004). Мастоцити ослобађају примарне и секундарне медијаторе запаљења. Примарни медијатори депоновани су у метахроматским гранулама мастоцита и ослобађају се непосредно након активације ћелије (Andelković и сар. 2009). У те тзв. преформиране медијаторе спадају хистамин, серотонин, протеоглигани, киселе хидролазе, неутралне протеазе, али и поједини цитокини (нпр. фактор некрозе тумора – TNF- α и IL-4) и хемокини. Мастоцити су једине ћелије које могу да ослободе претходно синтетисани TNF- α , 10 до 20 минута после активације, а који затим подстиче експресију Е-селектина на ендотелним ћелијама дермних крвних судова и интегрина на Лангерхансовим ћелијама (Worr и сар. 2007). Секундарни (новопроизведени) медијатори синтетишу се после активације мастоцита и секретују без претходног складиштења у гранулама и у њих спадају метаболити арахидонске киселине (леукотријени B $_4$ и C $_4$, простагландин D $_2$ и активирајући фактор тромбоцита (PAF)), бројни цитокини, хемокини и фактори раста, који испољавају проинфламаторне, антиинфламаторне и имунорегулаторне ефекте (Maurer и сар. 2003; Grimaldeston и сар. 2006).

При хронолошком старењу коже, мења се број и функција дермних мастоцита, док при фотостарењу долази до њихове интензивне дегранулације, тако да су промене карактеристичне за фотостарење коже, у смислу губитка колагених влакана и појаве дегенеративних еластичних влакана, често последица деловања протеаза из дегранулисаних мастоцита (Lavker и Kligman, 1988).

2.1.3.1.3. Макрофаги

Макрофаги су лутајуће ћелије везивног ткива (Andelković и сар. 2009). Настају од моноцита и заједно са својим претходницима сврставају се у моноклеусни фагоцитни систем, чинећи његову најбројнију популацију, која се налази у свим ткивима и органима. Макрофаги су хетерогена ћелијска популација која је одговорна за многобројне метаболичке, имунске и запаљенске реакције у физиолошким и патолошким стањима (Naito, 1993).

Заједно са дермним дендроцитима и Лангерхансовим ћелијама, макрофаги дерма репрезентују кожни одељак моноклеусног фагоцитног система (Leon и сар. 2005). У неповређеној кожи ткивни макрофаги се налазе у малој густини, 1-2 по mm^2 (Cai и сар. 1990). Плазмалема макрофага садржи различите интегралне протеине који делују као рецептори за широк спектар лиганата, као што су липопротеини, апоптотске ћелије или патогени (Naito, 2008). Захваљујући способности презентације антигена Т лимфоцитима (преко МНС молекула II класе) (Dennison и Van Dyke, 1997), ефекторних механизма, укључујући фагоцитозу, продукцију азотног оксида, као и способности да секретују широки спектар цитокина и хемокина, макрофаги имају незаменљиву улогу, како у урођеном, тако и у стеченом имунитету. Они су укључени и у иницирање, али и решавање инфламаторног одговора, а те две паралелне акције су описане и у *in vitro* истраживањима (Goerdт и Orfanos, 1999; Gordon, 2003). Иницирање инфламаторног одговора обезбеђују макрофаги који продукују веће количине проинфламаторних цитокина и реактивних врста кисеоника (ROS) (Goerdт и Orfanos, 1999). Такође, утичу на активност других ћелија и испољавају антитуморско дејство. Синтезом одређених ензима врше ремоделацију екстрацелуларног матрикса (Urmacher, 1997).

Светлосним микроскопом макрофаги дермиса не могу лако да се разликују од фибробласта и неких других ћелија дермиса. Међутим, када су активни, у њима се виде бројне фагоцитне вакуоле и тада се лако уочавају. У фагоцитним вакуолама макрофага дермиса често могу да се уоче меланозоми, и то обично више меланозома у једној вакуоли и тада се означавају као меланофаги (Urmacher, 1997).

На основу начина активације, макрофаги се класификују на фенотип M1 или макрофаге који имају класични пут активације (Tiemessen и сар. 2007) и фенотип M2 макрофаге који се активирају алтернативним путем (Stein и сар. 1992; Edwards и сар. 2006). M1 макрофаги се активишу преко микробних продуката или интерферона гама (IFN)- γ . Ови макрофаги продукују интермедијере азота и инфламаторне цитокине IL-1 β , TNF- α и IL-6 и промовишу активну инфламацију (Gordon, 2003; Mosser, 2003). M2 фенотип се активира стимулацијом интерлеукина IL-4 или IL-13 (Gordon, 2003; Mosser, 2003; Mantovani и сар. 2004). У оквиру M2 групе макрофага идентификовани су субсетови M2a, M2b и M2c који садрже специфичне цитокинско-хемокинске, као и површинско рецепторске профиле (Sica и сар. 2006), што условљава и неке разлике између субсетова (Lumeng и сар. 2007; Arnold и сар. 2007). Велико присуство оба субсета макрофага узрокује оштећење ткива у коме се налазе, зато што M1

промовише имунски одговор у правцу инфламације, а M2 спречава адекватан имунски одговор, узрокујући ремећење пре свега антитуморског имунског одговора (Sica и сар. 2006; Van Ginderachter и сар. 2006).

Макрофаги луче проинфламаторне цитокине, чија је улога да поспешују фагоцитозу, која најчешће резултује успешном неутрализацијом патогена (Trinchieri, 1997). Повезани су са васкуларном мрежом и имају улогу у зарастању рана, а такође, могу имати значајан утицај и у одређеним фиброзним обољењима, продукцијом TGF- β (Raes и сар. 2007).

За идентификацију макрофага у кожи дуго низ година користе се анти-CD14 и анти-CD68 моноклонска антитела, али данас се зна да ови маркери нису специфични за макрофаге (Zaba и сар. 2007).

Макрофаги поседују бројне мембранске рецепторе, међу којима су за фагоцитозу најважнији Fc рецептори, рецептори за компоненте комплемента и лектински рецептори (Gordon, 2007). Такође, поседују и рецепторе за цитокине који активирају макрофаге. То су рецептори за IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN- γ , факторе раста, попут макрофагно-стимулишућег фактора раста колонија (CSF-1), GM-CSF и TGF- β . Уз рецепторе, важну улогу имају и површински маркери макрофага као што су трансферински рецептор CD71 и мембрански гликопротеини породице интегрин- β (Takahashi и сар. 1996).

Gilchrest и сар. (1982) су саопштили да са старењем долази до смањења броја макрофага у кожи, што се одражава на имунску функцију коже. Снижење имунског надзора води ка канцерогенези која је заступљенија код старијих људи.

2.1.3.2. Екстрацелуларни матрикс

2.1.3.2.1. Колагена влакна у дермису

Колагена влакна су савитљиве протеинске нити отпорне на истезање. Влакна имају неодређену дужину и дијаметар 0,5-10 μm . Свако колагено влакно састоји се из мноштва паралелних влаканаца, која су изграђена од молекула колагена (тропоколагена), жилавих, нерастегљивих протеина (Anđelković и сар. 2009). Колаген је најзаступљенији протеин у људском телу и до сада је идентификовано тридесетак типова колагена које кодира најмање 30 гена (Ricard-Blum и Ruggiero, 2005).

Колаген чини преко 70% тежине дерма (McGrath и Uitto, 2010), односно 98% од масе сувог дермиса. Његова улога је да кожи обезбеди довољну растегљивост и чврстину. У самој кожи до сада је идентификовано десетак различитих типова колагена, који су у зависности од структуре и функције, разврстани у две групе:

фибриларне и тзв. FACIT колагене (engl. Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices) који су причвршћени за фибрилларне колагене (Miller и Gay, 1987; Gordon и Olsen, 1990; Garrone и сар. 1997).

Фибрилларни колагени формирају фибриле и њима у кожи припадају типови I, III и V, које карактерише дуги, централни, троструки хеликс, попречна испруганост на 64-67 nm и глицин-X-Y понављајућа секвенца (Garrone и сар. 1997; Ruggiero и сар. 2005). Колагени типа I и III су главни градивни елементи дермиса, превасходно одговорни за његову растегљивост и чврстину. У папиларном слоју коегзистирају као изоловани фибрили, а ретикуларном дермису ова влакна формирају дебеле снопове, отпорне на протеолитичку деградацију, што је основа стабилности коже (Fichard и сар. 1997). Колаген тип I, у кожи одрасле особе, чини 80% укупне количине колагена у дерму. Овај тип колагена формира дебела влакна и снопове различите дебљине. Молекул колагена тип I је хетеротример. Састоји се из два идентична $\alpha 1(I)$ ланца, и трећег $\alpha 2(I)$ ланца. Трећи ланац разликује се од $\alpha 1(I)$ ланца по свом аминокиселинском саставу (Ross, 2011). Колаген тип III, представља око 10% укупног колагена у хуманом дерму. Састоји се из три идентична α ланца, $\alpha 1(III)$, који се од ланаца колагена тип I разликују по већем садржају хидроксипролина и присуству цистеина (McGrath и Uitto, 2010).

Колаген тип IV налази се у ламини дензи у виду мреже влакана испреплетаних са другим компонентама базалне мембране. Састављен је из два полипептидна ланца. Молекул колагена тип IV карактерише се местимичним присуством прекида (engl. interapted) у оквиру троструког хеликса који омогућавају повезивање у три димензије, што доприноси флексибилности молекула, а тиме и базалне мембране (Khoshnoodi и сар. 2008). Колаген тип V гради танка влаканца која су често удружена са колагеном тип I. У кожи га има мање од 5% од укупне количине колагена. Његова функција није позната (McGrath и Uitto, 2010). Колаген тип VI састоји се из три различита α ланца, који сачињавају троструку хеликсну структуру. Садржи пептидне секвенце које могу служити као места за везивање ћелија. Колаген тип VI формира релативно танке микрофибриле које образују мрежу, независну од колагених влакана сачињених од колагена тип I и III и чија је улога да стабилизује колагена влакна (Fitzgerald и сар. 2008). Биохемијским техникама показано је да се овај тип колагена налази у релативно великој количини у различитим ткивима, па и кожи (Trüeb и сар. 1987). Такође је саопштено да је однос iRNK колагена тип I и колагена тип VI у култури кутаних фибробласта приближно 3:1, што може значити да се колаген тип VI у кожи

налази у количини која је већа од количине колагена тип III (Olsen и сар. 1989). Колаген тип VII главни је састојак усидравајућих филамената, који се пружају од дермно-епидермног споја до папиларног дерма (Ruggiero и сар. 2005). Синтетизују га дермни фибробласти уз активно учешће епидермних кератиноцита (König и Bruckner-Tuderman, 1991). Због свог необично дугачког троструко хеликсног региона, назива се и колаген са дугачким ланцем (engl. Long-chain collagen). Преклапањем карбокси-терминалних домена стварају се антипаралелни димери који се затим латерално спајају формирајући усидравајуће фибриле (Morris и сар. 1986). Велики аминотерминални неколагенски домени везују се са колагеном тип IV који се на једном крају налази у базалној мембрани, а на другом у папиларном дерму где образују усидравајуће плоче. Оваква структурна организација усидравајућих фибрила доприноси стабилности дермно-епидермног споја. Такође, колаген тип VII има афинитет за везивање са фибронектином преко колаген-везујућих домена на аминотерминалном крају молекула фибронектина (McGrath и Uitto, 2010).

Колаген тип VIII је у почетку изолован из културе ендотелних ћелија, али његова структура и ткивна дистрибуција још увек нису у потпуности разјашњени (Karadaglić и сар. 2000).

Колагени тип IX, XII и XIV припадају групи колагена која се назива FACIT колагенима. Ови типови колагена садрже више од једног троструко-хеликсног домена који је одвојен неколагенским сегментима и не секретује се као проколаген. Формирају влакна само када су удружени са фибриларним колагенима (Ross, 2011). На пример, колаген тип XII је у везивном ткиву удружен са колагеном тип I (Uitto, 1993). Углавном се налази непосредно испод дермно-епидермног споја и око фоликула длаке (Sasaki и сар. 1996). Прецизна улога овог типа колагена и количина која се налази у кожи није до краја разјашњена. Колаген тип XIV, као и остали типови колагена из ове групе, учествује у интеракцијама међу колагеним фибрилама, као и између колагених фибрила и других компоненти екстрацелуларног матрикса (Uitto, 1993).

Колаген тип XIII у малим количинама се налази у готово свим ткивима која садрже колаген тип I и III. Међутим, налази се и у ткивима која не садрже фибриларне колагене. Улога колагена тип XIII за сада није позната (Sandberg и сар. 1989).

Колаген тип XVII (BPAG2, BP180, HD4) је трансмембрански протеин типа II у саставу хемидезмозома базалних кератиноцита. Својим централним доменом који се

налази у ванћелијском делу молекула, образује тримере и највероватније улази у састав усидравајућих филамената (Hirako и сар. 1996).

Полуживот колагена износи око 5 година, а његова синтеза и деградација се настављају у току читавог живота (Lalević-Vasić и сар. 2008). У великом броју саопштења показано је да се укупна количина колагена смањује и у хронолошком и у фотостарењу коже (Chung и сар. 2001; Kim и сар. 2006; Fisher и сар. 2009).

2.1.3.2.2. Еластична влакна влакна у дермису

Еластична влакна су компонента ЕЦМ-а од које зависи еластичност ткива и органа. Тања су од колагених влакана и обично су испреплетана са њима (Anđelković и сар. 2009). Представљају релативно минорну структурну компоненту дермиса са учешћем од свега 2-4% у фотозаштићеној кожи одраслих, али неопходну за њену функцију. Еластична влакна се састоје од микрофибрила који чине основу влакна између којих се депонују молекули еластина аморфног изгледа (Midwood и Schwarzbauer, 2002). Еластин је протеин, а микрофибрили су нити дијаметра 10 nm, изграђене од гликопротеина фибрина (Anđelković и сар. 2009) које у току еластогенезе прве настају (Kielty и Shuttleworth, 1997).

Еластична влакна стварају фину мрежу кроз читав дермис, повезујући базалну мембрану са везивним ткивом хиподермиса. Систем еластичних влакана обухвата три врсте влакана-окситаланска, елауинска и еластична. Окситаланска влакна изграђена су искључиво од снопова микровлаканаца дијаметра 10 nm, састављених од различитих гликопротеина, укључујући фибромодулин I и II и велики молекул фибрин (Holbrook и Wolff, 1993; Ross, 2011). Током развоја између окситаланских влакана јављају се неправилне накупине еластина, па настају елауинска влакна. Ова влакна садрже мешавину еластина и микровлаканаца која немају правилну оријентацију. Налазе се око знојних жлезда и у дерму коже. Током треће фазе развоја, еластин се све више накупља, док не заузме цело средиште влакна које је још само на периферији окружено танким слојем микровлаканаца. Тако настају зрела еластична влакна, најбројнији припадници система еластичних влакана (Junqueira и Carneiro, 2005).

Еластична влакна су на специфичан начин распоређена у дерму. Окситаланска и елауинска влакна се скоро искључиво срећу у папиларном дерму, док се зрела еластична влакна пружају кроз читав ретикуларни дермис и хиподермис. Окситаланска влакна везују се једним крајем за базалну ламину и перпендикуларно пролазе кроз папиларни дермис да би се другим крајем везала за хоризонтално

постављена елауинска влакна. Елауинска влакна постепено се утапају у зрела еластична влакна која се између снопова колагених влакана пружају кроз читав ретикуларни слој дермиса (Bumbaširević, 2000).

Еластин, компонента матрикса еластичних влакана, настаје од секретованог, растворљивог прекурсора, молекула тропоеластина (молекулска маса 70kDa), кога производе фибробласти у везивном ткиву и глатке мишићне ћелије у крвним судовима. Тропоеластин се полимеризује и настаје аморфни гликопротеин сличан гуми, еластин који преовладава у зрелим влакнима (Plorper, 2007). Велики број других молекула, укључујући витронектин, фактор убрзавања деградације и фибронектин, су такође повезани са еластичним влакнима у кожи (Egles и сар. 2010; McGrath и Uitto, 2010).

Еластини се у ванћелијском матриксу организују у влакна, али успостављају и чврсту морфолошку везу са ћелијама које поседују специфичне рецепторе за ове протеине. Рецептори су образовани од три подјединице и еластин се везује за једну од њих, названу еластонектин. Ово повезивање омогућава синхронизовано понашање ћелија везивног ткива и еластичног влакна и утиче на низ унутарћелијских процеса попут регулације наглог уласка јона калцијума, уз истовремену инхибицију уласка јона калијума и олакшан улазак јона натријума (Šerban, 1995).

Метаболички обрт протеина везивног ткива, а посебно еластина, релативно је спор у поређењу са осталим протеинима. „Turnover“ еластичних влакана у дермису је у нормалним условима веома спор, али може бити убрзан под утицајем UV зрачења и инфламације. Ткива која садрже еластин у свом саставу имају и протеолизне ензиме који константно разграђују један део еластина, а који касније бива замењен новосинтетисаним молекулима. У класичне еластазе спадају серин протеазе. Остали ензими спадају у металоензиме, захтевајући калцијум за своју активност (Egles и сар. 2010).

Еластична влакна су подложна процесу старења и он се огледа у депоновању липида и јона калцијума између набора еластинских молекула, што доводи до поступног смањења њихове еластичности. Током процеса старења избацивање унутарћелијског калцијума је веома успорено, а повећана концентрација ових јона потпомаже програмирану смрт ћелије, док је истовремено значајно умањена кооперација са другим ћелијама у организму (Bailey, 2001; Robert и сар. 2008).

Разградња еластина значајно је повезана са различитим патолошким стањима, а дермална еластоza представља примарно обележје фотооштећене коже (Muto и сар. 2007).

2.1.3.2.3. Основна супстанца (аморфни матрикс)

Основна супстанца је прозиран високохидратисани гел који испуњава простор између ћелија и везивних влакана (Anđelković и сар. 2009). Има изглед аморфне, желатинозне и хомогене масе, састављене од гликозаминогликана, протеогликана, гликопротеина, минерала и ткивне течности (Watt и Fujiwara, 2011). Макромолекули екстрацелуларног матрикса пружају отпор притиску, а истовремено попуњавају међупросторе између влакана и ћелија. Гликозаминогликани (ГАГ) (дерматан-сулфат, хондроитин-сулфат, хијалуронска киселина) грађени су од понављајућих дисахаридних јединица. Такви молекули у воденој средини настоје да постигну испружену конформацију због чега заузимају велики волумен у поређењу са њиховом масом, што резултира обликовањем хидрогела. Негативно наелектрисање ГАГ-а привлачи позитивно наелектрисане јоне, који осмотским деловањем везују велику количину воде у ванћелијски матрикс дермиса (McGrath и Uitto, 2010). Степен хидратације ванћелијског матрикса првенствено зависи од количине хијалуронске киселине. Ова способност бубрења молекула везивањем воде омогућава пружање знатног отпора силама компресије (Џајковас, 2005; Ross, 2011).

У екстрацелуларном матриксу дерма налазе се и различити гликопротеински молекули (фибронектин, тромбоспондин, витронектин, ламинин и тенасцин), који су повезани са ћелијама и другим компонентама матрикса преко специфичних интегринских рецептора. Ове везе обезбеђују интеграцију екстрацелуларне мреже са цитоскелетним структурама и пружају могућност утицаја на експресију гена и фенотипске карактеристике ћелија дермиса (Stupack и Cheresh, 2002; Egles и сар. 2010). Захваљујући способности везивања за друге гликопротеине, колагена и еластична влакна, заједно са факторима раста, имају важну улогу у биолошким збивањима, попут ћелијског раста, адхезије, миграције, морфогенезе и диференцијације ћелија (El Ghalbzouri и сар. 2002; DeClerck, 2004; Silvestre и сар. 2009).

Са старењем се смањује количина хијалуронске киселине и хондроитин-сулфата, а повећава количина дерматан-сулфата (Џајковас, 2005). Бројне студије саопштавају да се гликозаминогликани, а посебно хијалуронска киселина смањују и у

фотостарењу, а да се насупротив хронолошком старењу, повећава количина протеогликана хондроитин- сулфата (Farage и сар. 2010).

2.1.4. Васкуларизација коже

Микроваскулатуру коже сачињавају артериоле, артеријски и венски капилари и венуле. Артериоле и венуле у дерму формирају две хоризонталне васкуларне мреже: горњу у папиларном дерму, од које се одвајају капиларне петље за папиле дерма и доњу, на граници између дерма и супкутаног ткива (McLafferty и сар. 2012). Перфорантни крвни судови, доње васкуларне мреже, долазе из супкутаног ткива и мишића и преко артериола и венула се повезују са горњом васкуларном мрежом. Одређене анастомозе постоје и између асцендентних и десцендентних венула у дерму. Већина крвних судова коже налази се у папиларном дерму, 1-2 μm испод површине епидерма (Yen и Braverman, 1976). Крвни судови у папиларном дерму имају пречник од 10 до 35 μm , али већина се налази у распону од 17 до 22 μm (Braverman, 1997). У средњем и дубоком дерму крвни судови су већег пречника, од 40 до 50 μm (Braverman и Sibley, 1990).

Артериоле папиларног дерма представљају терминалне артериоле, пречника од 17 до 26 μm (Braverman и Sibley, 1990; Braverman, 1997). Ендотелне ћелије ових артериола окружене су са два слоја глаткомишићних ћелија-унутрашњег хоризонталног и спољашњег спирално распоређеног слоја. Лонгитудинална еластична влакна смештена су у простор који формирају цитоплазматски продужеци ендотелних и глаткомишићних ћелија (Yen и Braverman, 1976). Артеријски капилари имају пречник од 10 до 12 μm (Braverman, 1993). Капиларни зид је дебљине од 2 до 3 μm , ретко 0,5-1 μm (Yen и Braverman, 1976; Braverman, 1993). Око ендотелних ћелија је континуирана базална мембрана, дебљине око 30-50 nm, а у адвентицији капилара налазе се периваскуларне ћелије-перицити који формирају чврсте спојеве са ендотелним ћелијама (Joусе и сар. 1985). Спољашњи и унутрашњи пречници венских капилара идентични су артеријским капиларима. Перицити и адвентицијске ћелије представљају најважније ћелијске елементе у зидовима венских капилара (Yen и Braverman, 1976). Венски капилари спајају се са посткапиларним венулама, крвним судовима чији се спољашњи пречник повећава од 12 до 35 μm и унутрашњи од 8 до 26 μm . Представљају најбројније крвне судове у дерму. Дуги и уски продужеци ендотелних ћелија пробијају базалну мембрану и успостављају мембранске контакте

са периферним слојем перицита. Перицити формирају два до три слоја и прекривају приближно 80% површине ендотелних ћелија (Braverman, 1997). Капиларне петље потичу од терминалних артериола хоризонталне папиларне мреже. Састоје се од асцендентне гране, интрапапиларног полукружног дела и десцендентне гране која се касније спаја са посткапиларном венулом хоризонталне мреже. Свака дермна папила садржи по једну капиларну петљу која се састоји од интра- и екстрапапиларног дела. Асцендентна грана капиларне петље полази из хоризонталне мреже и има све карактеристике артеријских капилара. Десцендентна грана капиларне петље има шири пречник од асцендентне гране (Braverman, 1997). Дубоки дермни и супкутани крвни судови имају веће пречнике који износе око 50 μm и дебљи зид -10 до 16 μm . Глаткомишићне ћелије или перицити присутни су у четири или пет слојева, а колагена влакна у артериолама налазе се субендотелно (Braverman и Keh-Yen, 1981; Braverman и Keh-Yen, 1983). Сабирне венуле пролазе кроз дубоки део дерма до површног слоја масног ткива (Braverman и Keh-Yen, 1983). Пречници ових крвних судова крећу се од 70 до 120 μm . Сабирне венуле надовезују се на посткапиларне венуле и повезују их са венулама мишићног типа. На местима уливања мањих крвних судова налазе се венулски залисци који су присутни и у већим судовима без бочних огранака. Функција залистака састоји се у обезбеђивању усмереног протока кроз венски систем (Braverman, 1997). У неким деловима коже, терминални огранци артерија нису повезани са почетним деловима венског система преко капиларне мреже, већ помоћу специфичних крвних судова-артериовенских анастомоза. То су кратки, изувијани каналићи, организовани у облику специфичних лоптастих структура, гломуса, где су 2-4 артериовенске анастомозе изувијане и окружене епителоидним ћелијама и везивним ткивом. Артериовенске анастомозе налазе се у кожи дланова, табана, прстију, носа и капака. Крв из артериовенских анастомоза одлази у једну кратку вену широког лумена, затим у тзв. перигломусну вену, и на крају у околни венски систем коже (Braverman, 1997).

Многе студије су показале да је кожа у старењу релативно „аваскуларна“ (Gilchrest и сар. 1982). Микроваскуларне промене, откривене код старијих особа, испољавају се стањењем зида крвних судова и смањењем броја капиларних петљи, најизраженије видљивим у посткапиларним венулама (Kelly и сар. 1995). Дебљина овако измењених зидова износи приближно 0,5-1 μm (Braverman, 1997). Једна студија је показала 35% редукцију венских крвних судова код старијих, у односу на млађе особе. Ово смањење васкуларне мреже је посебно видљиво у папиларном слоју дерма,

са нестанком вертикалних капиларних петљи. Последица ове редукције је смањен крвни проток, смањена размена хранљивих материја, оштећена терморегулација, нижа температура површине коже и бледило коже (Gilchrest и сар. 1982а). За сада нема података о биохемијској природи материјала који се налази у зидовима крвних судова остареле коже (Sueki и сар. 1995).

Оштећења микроваскулатуре дуготрајним дејством UV зрачења, манифестује се повећањем отпорности на дијастазу и реакцијом са PAS материјама. Захваћени су само крвни судови папиларног дерма, с тим што посткапиларне венуле трпе већа оштећења од терминалних артериола и капилара. Електронском микроскопијом уочава задебљање крвних судова. Претпоставља се да су Вео-ћелије активно укључене у процес депоновања због њиховог повећаног броја и величине и присуства материјала налик базалној мембрани на луменској и аблуменској страни ћелија. Идентичне промене виђају се код болесника са дијабетесом, порфиријом и понекад, на остарелој, фотонеекспонираној кожи (Braverman, 1997).

2.2. Имунохистохемијски параметри

2.2.1. Васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF)

Истраживања вршена последњих година показала су да породица васкуларних ендотелних фактора раста – VEGF протеина (engl. vascular endotelial growth factor) и њихових рецептора представља кључни медијатор, како у току ембрионалног развоја васкуларизације, тако и у току физиолошке и патолошке ангиогенезе код одраслих. Такође је установљен и његов значај у контроли репарације и ремоделовању васкуларног система. VEGF породица се састоји од седам чланова (VEGF-A до VEGF-F) и фактора раста плаценте (PIGF) који се јављају у неколико различитих варијанти и облика (Ferrara, 2004). Ови чланови имају заједничку структуру, али различите физичке и биолошке особине. Везују се на три рецептора тирозин киназе, познате као VEGFR-1, -2, и -3, као и за ко-рецепторе, укључујући неуропилине (NRP), хепарин сулфате и протеогликане (Ferrara, 2004; Olsson и сар. 2006) за чију експресију су највећим делом одговорне ендотелне ћелије (Olsson и сар. 2006), мада могу да их продукују и макрофаги, неутрофили и перицити (Lauer и сар. 2000).

У здравој кожи присуство VEGF-A није мерљиво. Међутим, механичке повреде коже изазивају снажну експресију VEGF-A, која је временски и просторно у корелацији са пролиферацијом нових крвних судова (Brown и сар. 1992). Недавна истраживања су показала да VEGF-C може да има двоструку улогу и као индуктор

ангиогенезе, а и лимфангиогенезе (Saaristro и сар. 2006). VEGF D изазива ангиогенезу и раст лимфних судова код одраслих, као одговор на патолошка стања, укључујући исхемију или туморгенезу (Staker и сар. 2001). Протеолиза је означена као један од првих и најважнијих фактора укључених у процес стварања нових крвних судова, па су и бројне протеазе, укључујући и матриксне металопротеиназе (MMPs) укључене у процес ангиогенезе (Schumacher и сар. 1998).

UV зрачење подстиче ангиогенезу повећањем експресије VEGF (Kosmadaki и сар. 2003; Yano и сар. 2004; 2005) и смањењем тромбоспондина-1 (Howell и сар. 2004), што узрокује имуносупресију (Noonan и сар. 1981), као и одлагање хиперсензитивне реакције након излагања UV зрачењу (Molendijk и сар. 1987).

2.2.2. Тумор протеин P53

TP53 (Тумор протеин 53, p53) је један од најбоље проучених тумор супресорских гена, са кључном улогом у генези хуманих канцера (Ruddon, 2007). Мутације тумор супресорског гена TP53 најчесталије су генетске алтерације у хуманом канцеру које погађају специфични ген (Petitjean и сар. 2007; Marrot и Meunier, 2008; Olivier и сар. 2009).

Тумор протеин 53 први пут је описан 1979. године (Crawford, 1983), али је велику пажњу истраживача и научне јавности почео да привлачи десет година касније, 1989. године, када су по први пут описане алтерације овог гена у хуманим канцерима (Baker и сар. 1989). Због његовог надзора над бројним ћелијским функцијама назван је заштитником или „чуварем генома,, (Matlashewski и сар. 1984).

Ген p53 смештен је на кратком краку хромозома 17 (Isobe и сар. 1986) и кодира синтезу хуманог p53 протеина, сачињеног од 393 аминокиселине. Веома је важан за механизме репарације DNK јер спречава неопластичну трансформацију ћелија. У ћелијама које су у стању угрожености најпре долази до драстичног продужења полуживота p53 и његове брзе акумулације (Olivier и сар. 2009), а у случајевима леталног оштећења DNK изазваног UV зрацима, p53 индукује покретање процеса програмиране ћелијске смрти и стварање SBC (engl. sunburn cell) ћелија (Mullauer и сар. 2001; Matsumura и Ananthaswamy, 2004; Kumar и сар. 2010).

P53 активира се као одговор на DNK оштећење, појаву једноланчане DNK, оксидацијски стрес, осмотски шок, деплецију рибонуклеотида, нерегулисану експресију онкогена и друге разноврсне видове стреса. Након оштећења DNK,

најчешће изазваног UV зрачењем, p53 се активира фосфорилацијом (Benjamin и сар. 2008). P53 протеин формира тетрамере кроз интеракције између с-терминалних подручја протеина. Ови тетрамери могу препознати специфична везна места на циљним генима и стимулирати њихову активацију (Benjamin, 2007).

Механизми којима се остварује тумор супресорска функција TP53, су блокирање ћелијске деобе на прелазу из G1 у S фазу ћелијског циклуса, стимулација поправке оштећења DNK и индукција апоптозе. Зауостављањем ћелијског циклуса, TP53 обезбеђује време, потребно, да се репарационим механизмима уклоне оштећења пре репликације DNK (S фаза), активацијом интегрише различите сигнале стреса, након чега иницира пролазно или трајно зауостављање ћелијског циклуса или иницира апоптозу, у зависности од степена оштећења ћелије. На тај начин тзв. „дивљи“ p53 спречава умножавање мутиране и оштећене DNK (Olivier и сар. 2009).

У случају губитка функције TP53 долази до акумулације мутација и канцера (Rodier и сар. 2007). Ген p53 може се инактивирати тачкастом мутацијом (Joerger и сар. 2006) и то само једног алела, а не као остали тумор супресорски гени, мутацијом једног и губитком здравог алела (Olivier и сар. 2009).

У нормалним ћелијама „дивљи“ тип p53 протеина који има кратко време живота (6 до 30 минута), налази се у врло малим количинама због сталне разградње и не може се приказати стандардним имунохистохемијским бојењем (Barret и сар. 1997; Stratigos и сар. 2005). Мутирани p53 ген, обично кодира стабилнији протеин с продуженим временом живота који се приказује имунохистохемијским бојењем, те се имунохистохемијска анализа изражености p53 сматра корисним показатељем мутација p53 (Kubo и сар. 1994; Stratigos и сар. 2005; Campbell и сар. 1993). Упркос томе, могућа су позитивна имунохистохемијска бојења без мутација и обрнуто (Campbell и сар. 1993; Moles и сар. 1993).

Мутације p53 присутне су у више од 50% свих базалиома коже (Kubo и сар. 1994; Benjamin, 2007), актиничким кератозама и Bowenovoj болести (de Gruijl, 2002; Matsumura и Ananthaswamy, 2004). Оне су најчешће последица деловања UV зрачења (Benjamin и сар. 2008). Инактивација p53 у епидермним кератиноцитима дестабилизује геном у целости и има улогу у раној фази карциногенезе у кожи (Puizina-Ivić, 2009; Melnikova и Ananthaswamy, 2005). Код људи је доказана експресија p53 (Agar и сар. 2004) у епидермним кератиноцитима већ након дозе зрачења од 25 J/cm² UVA I зрака (Seite и сар. 2000), а са повећањем дозе зрачења повећава се и експресија овог протеина (Burren и сар. 1998; Beattie и сар. 2005). Barnadas и сар. (1996)

показали су, да је експресија гена p53 у једрима кератиноцита била испољена у 7 од 18 узорака коже човека, узетих са фотоекспонираних области и само у 1 од 9 узорака фотонеекспонираних, интактне коже.

Израженост p53 забележена је и у нормалном епидермису коже која је трајно изложена UV зрацима (нпр. лице), као и у клинички непромењеном епидермису у околини базалиома (Urano и сар. 1995; Demirkan и сар. 2000). Имунохистохемијска израженост p53 на тим местима могла би значити зачетак карциногенезе или представљати ширење туморских ћелија изван клиничких граница базалиома. У експериментално изазаваним туморима на бездлаким мишевима показано је да се мутације на p53 тумор супресор гену могу регистровати месецима пре појаве тумора и да су углавном последица UVB зрачења (Berg и сар. 1996; Ananthaswamy и сар. 1998).

Такође, ћелијска сенесценца и старење ткива важне су биолошке последице активације p53 генотоксичним стресом и значајно доприносе његовој тумор-супресорској активности. Једна од функција p53 је контрола репликативног старења ћелија (Жижина, 2002).

2.2.3. Виментин

Виментин је протеин молекулске тежине 52–57 kD, члан фамилије интермедијерних филамената и заступљен у ћелијама мезенхимског порекла (фибробласти, ендотелне ћелије, глатке мишићне ћелије, хондроцити, лимфоцити и ћелије крви) (Battifora, 1991), као и у ембрионалним и недиферентованим ћелијама (Anđelković и сар. 2009). Често се користи као специфични имунохистохемијски маркер фибробласта (Battifora, 1991) при чему је њихова идентификација заснована на вретенастом облику, у комбинацији са позитивним бојењем за маркер виментин и одсуству бојења за епителијалне или друге мезенхимске ћелије, као што су мишићне ћелије, астроцита или хематопоезне ћелије (Chang и сар. 2002). Међутим, овај приступ није до краја коректан јер фибробласти могу имати различите облике у различитим ткивима, док виментин-позитивне ћелије које нису фибробласти, укључујући макрофаге, такође могу имати вретенаст изглед. Осим тога, виментин боји велики број типова ћелија, па је тешко идентификовати фибробласте системом елиминације (Goodpaster и сар. 2008).

Виментин постоји у ћелијама, углавном као филаментозни полимер, али се и мали део растворљивих тетрамера може наћи у ћелијама (Chou и сар. 1990). Слично

осталим интермедијарним протеинима, виментински филаменти садрже централну нит, са регионима главе и репа (Parry, 2005). Региони главе и репа су јединствени за сваки интермедијарни филамент и верује се да су одговорни за специфичне карактеристике. Виментин интерагује са структурним и сигналним молекулима преко домена главе и репа. Поред тога, фосфорилација домена главе и репа је кључни регулатор динамике виментинске мреже (Omara и сар. 2006).

Виментин је неопходан за велики број виталних ћелијских функција, попут покретљивости, хемотаксе и зарастања рана (Eckes и сар. 1998; 2000). Постоје јасни подаци да је биолошки утицај промењеног виментина, губитак контрактилних капацитета фибробласта, што убрзава процесе старења. Показано је да виментин *knockout* мишева има поремећену способност у зарастању рана *in vivo* (Eckes и сар. 2000).

2.3. Ембрионални развој коже

Кожа има двојако порекло. Епидерм се развија од површинског ектодерма, док дермис и хиподермис настају од мезенхима соматоплеуре и дерматома (Nikolić и сар. 2007). Од површинског ектодерма настају кератинизујући покровни епидерм и његова аднекса (Petrović, 2001).

У трећој недељи феталног живота епидерм се састоји само од једног реда недиферентованих полигоналних ћелија испуњених гликогеном-базални слој (*Stratum basale*) (Holbrook и Hoff, 1984; Paravina и сар. 2006). У другом месецу развића се деобама ових ћелија, преко њих ствара нов површински слој састављен од плочастих ћелија (Nikolić и сар. 2007), перидерм који належе на слој ћелија са пролиферацијском способношћу-базални слој (Paravina и сар. 2006). Са настанком овог двослојног епидерма долази до појаве дезмозома између његових ћелија. Од герминативног слоја настаће дефинитивни постнатални епидерм. Перидерм је привремени слој и виђа се само током интраутериног развоја (Petrović, 2001).

Пролиферација герминативног слоја доводи до стварања слојева интермедијарних ћелија које се налазе између герминативног слоја и перидерма. До 19. недеље развија се неколико слојева интермедијарних ћелија, а почевши од 20. недеље глобуларни делови ћелија перидерма почињу да се одвајају и опадају у амнионску течност, а ћелије перидерма постају спљоштеније (McGrath и Uitto, 2010).

Оне такође подлежу кератинизацији и на тај начин, стварају једну привремену заштиту, исподлежећем сталном епидерму у развоју. Све до порођаја, скваме перидерма опадају у амнионску течност и тако доприносе стварању *vernix caseosa*, слоја ћелијског дебрија који покрива фетусну и кожу новорођенчета (Petrović, 2001).

У четвртном месецу развића епидермис поседује четири слоја: *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* (чије ћелије садрже кератохијалинске грануле) и *Stratum lucidum* (Nikolić и сар. 2007).

Још од раних стадијума, ћелије свих слојева епидерма у развоју су испуњене гранулама гликогена, а смањење количине ових гранула је удружено са одмицањем биосинтетских активности, усмерених ка почетној кератинизацији, која се манифестује појавом различитих ензима и кератина. Са диференцијацијом између 10. и 12. недеље, у интермедијарним ћелијама долази до смене простијих, лакших кератина, присутних из ранијег периода, кератинима веће молекулске тежине, а затим и појаве профилагрина и филагрини и појаве кератохијалинских гранула после 20. недеље између снопова влакана у најповршнијим ћелијама интермедијарног слоја (McGrath и Uitto, 2010). Топофиламенти су појединачни до 16. недеље, док се густе акумулације запајају у ћелијама интермедијарног слоја, као доказ почетка кератинизације. Прве потпуно кератинизоване ћелије јављају се одмах после тога, а кератинизација је добро развијена са 23. недељом у интермедијарном слоју у коме се запајају кератохијалинске грануле. Између 24. и 26. недеље, дефинитивни корнеални слој се јавља у неким подручјима, а са 30. недељом или више, поред нешто заосталог гликогена у интермедијарним ћелијама, интерфоликуларни епидерм је у суштини сличан постнаталном. Током овог периода већина ћелија перидерма је отпала, а кератинизујуће ћелије су остале испод представљају новостворени корнеални слој (Petrović, 2001).

Почетком другог месеца развића меланобласти из нервног гребена мигрирају у дермис, а нешто касније, у трећем месецу, и у базални слој епидермиса. Крајем трећег и у четвртном месецу развића епидермис насељавају и Лангерхансове ћелије које потичу из коштане сржи. Меркелове ћелије највероватније потичу од неуралне кресте и у периоду од 8. до 12. недеље насељавају епидермис (McGrath и Uitto, 2010).

Дермис се развија од соматског мезодерма и од дерматома. На глави и врату дермис настаје од ектомезенхима (Nikolić и сар. 2007). У мезодерму, непосредно испод епидерма, прва везивна влакна почињу да се јављају у 3. месецу развоја плода, што се сматра почетком сазревања дерма (Paravina и сар. 2006). Тада се формирају

папиле дермиса које садрже тактилна телашца (Nikolić и сар. 2007). Крвни судови коже први пут се јављају у 2. месецу, а масно ткиво у 7. месецу (Paravina и сар. 2006).

2.4. Старење коже

2.4.1. Опште теорије старења

Старење је базични биолошки процес, карактеристичан за све живе организме. У савременој стручној литератури, која се бави феноменом старења, појављују се различите хипотезе узрока старења, које се могу објединити у неколико група. Прву групу би чиниле теорије генетске контроле, репликативне старости ћелија, митохондријална теорија старења, теломеразна теорија, итд. Друга група теорија објашњава старење преко деловања спољашњих фактора (теорија слободних радикала, теорија истрошености имунског система, итд). Трећа група група разматра промене у неуроендокрином систему, енергетски дисбаланс, итд. (Fisher, 2002). Ипак, све хипотезе виде у основи старења узрасно-зависно смањење функција ћелија, које доводи до неспособности ћелија да издрже спољашње и унутрашње изазове, доводећи до структурно-функционалних промена организма у целини (Yaar и Gilchrist, 2003).

Бројни подаци указују да се у ћелијама, током живота, *in vivo*, акумулирају оштећења, која доводе до постепеног губитка диференцираних функција и степена раста. Ове промене доводе до слома нормалних хомеостатских механизма. Постепена редукција ћелијских функција, као и смањење капацитета раста ћелија, у корелацији са старењем, заснована је на дискоординацији интерактивних путева у самим ћелијама, као и између ћелија и ткива (Anisimov, 2008).

Са старењем се мењају основне структурне компоненте мембранског система ћелија, односно, јављају се квантитативне и квалитативне промене засићених и незасићених масних киселина које су део грађе ових мембрана. Управо је повећање пероксидације липида мембране, које се појављује током старења, узрок ригидности мембране. Временом се губи флуидност плазма мембране, али и мембрана субцелуларних структура. Са годинама, поред ригидности, у њој се због инсерције измењених протеина јављају и нове детерминанте (Caprari и сар. 1999).

Митохондријска теорија старења објашњава дугогодишњом акумулацијом мутација соматске митохондријске ДНК (mtDNA). Сматра се да генетска нестабилност ваннуклеарног генома доприноси старењу, као и да се различите

алтерације митохондријске DNK, укључујући тачкасте мутације, делеције и оксидативне модификације, повећавају са старењем више у постмитотским него у митотским ткивима (Lee и сар. 1997; Wallace и сар. 1998). Иако се мутације mtDNK накупљају са годинама, претпоставља се да оне не представљају примарни узрок, већ само доприносе старењу. Сви досадашњи резултати показују да су мутације mtDNK малобројне до 40. године живота, а да се касније њихов број експоненцијално повећава (Lee и сар. 1997).

Досадашња испитивања повезаности промена у грађи протеинских молекула и процеса старења показала су да се са старењем смањује синтеза протеина, што води њиховом успореном обнављању, као и да оштећења настала као резултат смањене синтезе или дејства спољашњих фактора могу нарушити метаболичке и репликативне способности ћелије (Van Remmen и сар. 1995). Због тога, акумулација посттранслационо измењених протеина током старења представља један од најробустнијих биохемијских налаза у ткивима различитих организама, а многи научници управо у овоме виде кључ старења и умирања (Ђорђевић и сар. 2000).

Две теорије објашњавају ограничење капацитета репликације. Прва се позива на постепено накупљање мутација (Banett, 1997), а друга је заснована на постојању молекуларног сата (сатова), који регулише ћелијски циклус и ограничава капацитет деобе ћелије (Harley и сар. 1990). Данас се верује да је друга теорија исправна и да суштину овог сата представља стално трошење теломера. Теломере су понављајуће секвенце DNK, које се налазе на крајевима линеарних хромозома. Њихова дужина представља биомаркер или митотски сат за старост ћелије. Скраћивање теломера је механизам који ограничава капацитет деобе ћелије, а дужина теломера је критеријум који одређује улазак у ћелијску старост (Goldstein, 1990).

Према имунској системској теорији старења многи ефекти карактеристични за старење настају због смањене способности имунског система да разликује сопствене од страних протеина, што објашњава већу инциденцу аутоимунских болести код старијих особа. Са старењем, на меморијским Т лимфоцитима се смањује експресија CD28 молекула и П-2 рецептора, као и количина П-2, што може бити узрок смањењења пролиферативног потенцијала (клонске експанзије) у одговору на антиген. Осим тога, показано је повећање односа између CD8 Т и CD4 Т лимфоцита (CD8 Т лимфоцити постају отпорнији на апоптотичне сигнале) (Effros, 1998) и смањује се активност Nk ћелија, што се компензује повећањем њиховог броја. Промене су детектоване и у функцији В лимфоцита (смањује се способност

продукције антитела и експресија CD40 молекула на површини В лимфоцита) и моноцита (редукована је синтеза интерлеукина 1 и реактивних врста кисеоника које макрофаги користе за уништење страних и неопластичних ћелија) (Hodes, 2005).

2.4.2. Старење коже

Промене на кожи су највидљивији показатељи старења. Клиничке манифестације тих промена су дисколорација, боре и губитак текстуре коже. За разлику од других органа, кожа је у директном додиру са спољашњом средином, и стари, што је последица штете коју јој наноси спољашња средина. На овај процес, наследни, генетски утицаји, како се сада сматра, учествују са свега 3% (Robert и сар. 2009).

Два главна типа старења коже су интринзичко и екстринзичко старење. Интринзичко старење је генетски програмирано старење, инволутивно, познато и као хронолошко старење, док је екстринзичко старење узроковано факторима спољашње средине, као што су Сунчева светлост, нарочито UV зраци (фотостарење), стрес и загађење (Chauhan и Shakuа, 2009). Премда су и фотостарење и хронолошко старење одговорни за настанак бора, сматра се да су боре код фотостарења дубље и грубље од оних које су изазване хронолошким старењем (Papanagiotou, 2009).

2.4.2.1. Утицај полних хормона на старење коже

Алтерације у неуроендокриној контроли хомеостатских механизма резултују појавом, за старост карактеристичних, физиолошких промена. Нивои многобројних хормона, попут мелатонина, хормона штитасте жлезде, хормона раста и дехидроепиандростерона, опадају са старењем. Хормон раста опада са старењем за око 14% после 25. године, што доводи до повећања количине масног ткива, губитка мишићне масе и деминерализације костију (Berneis и Keller, 1996).

Кожа представља важан орган за утицај многих хормона, од којих се највећи значај приписује полним хормонима. Рецептори полних хормона налазе се у свим дермним структурама (Raine-Fenning и сар. 2003), а сами полни хормони имају важан утицај на развој коже и њену грађу. Зна се, да је нормалан ниво полних хормона неопходан за одржавање структурне целовитости коже и правилно одржавање њене функције. Естрогени утичу на дебљину коже, њену еластичност, хигроскопна својства, баријерну функцију, раст длаке и др. (Hall и Phillips, 2005).

Улазак жена у менопаузу карактерише престанак оваријалне секреције прогестерона и естрадиола. Познато је да естрогени регулишу различите функције ћелије, укључујући пролиферацију, морфогенезу, диференцијацију и апоптозу. Механизми којима естрогени регулишу функцију ћелија су сложени (Verdier-Sévrain и сар. 2006) и одвијају се преко генотропног и негенотропног механизма. Негенотропним механизмима естрогени делују на фибробласте дермиса и примарно их штите од апоптозе (Hall и Phillips 2005; Verdier-Sévrain и сар. 2006).

Утицај ендогених естрогена на епидермис није потпуно разјашњен, за разлику од утицаја екзогених естрогена при примени хормонске супституционе терапије. Кератиноцити садрже обе изоформе естрогенских рецептора ($ER\alpha$ и $ER\beta$) и при физиолошким концентрацијама естрадиол се са високим афинитетом веже за ER кератиноцита. У раздобљу менопаузе и постменопаузе епидермис атрофира. Такође је показано, да код жена које су одређено време примале супституциону хормонску терапију долази до повећања дебљине епидермиса. У *in vitro* испитивањима естрадиол подстиче пролиферацију кератиноцита и DNK синтезу и супримира њихову апоптозу посредством специфичних регулаторних протеина ћелијског циклуса (нпр. подстиче експресију Bcl-2 и циклина D2). Такве учинке естрадиол постиже негенотропним механизмом (Kanda и Watanabe, 2003).

Естрогени, такође, подстичу меланогенезу (Čajkovac, 2005; Verdier-Sévrain и сар. 2006). Након оваријектомије меланоцити су скврчени и деформисани, а већим дозама естрогена постиже се враћање меланоцита у нормално стање (Čajkovac, 2005). Меланоцити имају $ER\alpha$ рецептор, а одређена истраживања сугеришу да естроген делује на активност ензима тирозиназе који учествује у биосинтези меланина. Супротно томе, меланоцити коже гениталног подручја имају андрогенске рецепторе и високу активност 5-редуктазе, ензима који учествује у претварању тестостерона у 5-дихидротестостерон што утиче на активност тирозиназе (Verdier-Sévrain и сар. 2006). Повећање концентрације естрогених хормона јајника и/или гонадотропних хормона аденохипофизе доводи до настанка хиперпигментација на различитим подручјима тела, која су изложена Сунчевом зрачењу за време трудноће код чак 70% трудних жена (*Chloasma sine Melasma gravidarum*) (Čajkovac, 2005).

Већина истраживања је утврдила повезаност нивоа естрогена и садржаја колагена у дерму. Значајно смањење садржаја колагена и еластина у дерму, повезано је са раздобљем менопаузе и постменопаузе, што упућује на повезаност естрогена и биосинтезу влакнастих протеина код жена. У просеку се око 30% колагена губи у

првих 5 година након менопаузе или се просечно садржај колагена смањује 2,1% сваке године постменопаузе, током 20 година (Affinito и сар. 1999).

Фибробласти жена у менопаузи и постменопаузи стварају мање колагена. Показано је да изоловани фибробласти, у култури ћелија, задржавају способност биосинтезе значајне количине колагена (посебно колагена тип I), након што су подстакнути специфичним ендогеним чиниоцима, као и да естрогени утичу на функцију фибробласта, повећавајући брзину стварања колагена (Реріс и сар. 2011).

Хидрофилни гликозаминогликани су одговорни за задржавање воде у дермису. Количина гликозаминогликана се смањује са старењем, у корелацији са нивом концентрације естрогена. Повећана концентрација естрогена у плазми повећава биосинтезу хијалуронске киселине, што доприноси хидратацији дермиса (Verdier-Sevrain, 2007).

Учинак естрогена на циркулацију у дермису је недовољно испитан. Познато је да се периферна микроциркулација значајно смањује у раздобљу менопаузе, а истраживања на животињама показују да естрогени мењају васкуларизацију коже. Изражена субкутана и дермна вазодилатација у подручју лица, врата, прса, дланова и табана је карактеристична за жене у менопаузи, а резултат је лоше контроле периферне циркулације услед смањења естрогена (Brincat, 2004).

2.4.2.2. Улога слободних радикала у процесу старења

2.4.2.2.1. Слободни радикали

Нобеловци Semenov и Hinšelvud (1956), први су указали на чињеницу да се бројни хемијски процеси одвијају путем формирања слободних радикала и то пре свега реактивних врста кисеоника (ROS) (engl.Reactive Oxygen Species). Идеју да слободни радикали утичу на старење, те исте године презентовао је Denham Harman, сматрајући да слободни радикали кисеоника вероватно настају као споредни продукти у ензимски контролисаним реакцијама и да представљају „Пандорину кутију зла“, одговорну за велика ћелијска оштећења, мутагенезу, канцерогенезу, дегенеративне процесе, старење, итд. (Harman, 1956; Wickens, 2001; Harman, 2006).

Данас се зна да су слободни радикали (CP) (engl. RS reactive species) атоми, молекули или јони који садржи један или више неспарених електрона у спољној електронској љусци (Halliwell и Gutteridge, 1989). Ова дефиниција укључује у ову групу једињења: водоник H^+ , већину метала са променљивом валенцом и сам молекул кисеоника. Присуство неспареног/неспарених електрона CP чини врло реактивним. Они лако и брзо реагују са свим класама биомолекула из окружења (липидима,

протеинима, DNK), што за последицу има оштећење ћелијских функција (Halliwell, 1994; Anderson 1996; Siems и сар. 1998.).

У зависности од активног центра у CP деле се на CP са: кисеоником (ROS, engl. Reactive oxygen species); азотом (RNS, engl. Reactive nitrogen species); угљеником (RCS, engl. Reactive carbon species) и сумпором (RSS, engl. Reactive sulfur species) (Halliwell и Gutteridge, 1989). Углавном настају из четири основна типа реакција: термоллиза, фотолиза, оксидо-редукциони процеси и ирадијација високе енергије (Piletić и сар. 1992). Мада су слободни радикали у организму обично присутни у врло ниској концентрацији (10^{-5} – 10^{-9} mol), јер живе врло кратко ($<10^{-10}$ s) показују, пре свега, токсичне ефекте, јер је већина слободних радикала врло реактивна (константа брзине реакције слободних радикала са кисеоником је $10^9 \text{ mola}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Popović, 2004).

Слободни радикали се у организму стварају у физиолошким условима, током процеса оксидативне фосфорилације у митохондријама (Wei и Lee, 2002) оксидоредукције у присуству метала са променљивом валенцом (Halliwell, 1995), аутооксидације бројних малих молекула, метаболизма етанола, ензимске реакције катализоване оксидазама, синтезе еикосаноида, липидне пероксидације незасићених масних киселина (Crane и Masters, 1984). Одређен физиолошки ниво ROS-а неопходан је за правилно функционисање ћелије и укључен је у процесе интрацелуларне сигнализације, активације транскрипције, пролиферације, апоптозе и биосинтезе простанглидина (Herrera и сар. 2001). Значајана је и њихова улога у хомеостазу раста и развоја ткива, као и у ембриогенези (Hengartner 2000; Das и Maulik, 2004).

CP се генеришу и у инфламацији, током процеса фагоцитозе (Bailey и сар. 1993; Knight, 2000), као део одбрамбеног арсенала фагоцитних ћелија (полиморфонуклеара, макрофага, моноцита) (Fatima и сар. 2004). Такође се зна да се слободни радикали стварају и у неким патолошким стањима, као што су аутоимунске, неуродегенеративне, малигне и кардиоваскуларне болести, стања исхемије, хипоксије, хипероксије, реперфузије (Јовановић и сар. 1994). Биотрансформацијом ксенобиотика, током метаболизма егзогено унетих једињења (храна и лекови) и код професионалне експозиције, потенцијално токсичним једињењима, као и код дејства фактора спољашње средине (UV зрачење, јонизујуће зрачење, аерозагађење) долази до стварања слободних радикала. Појачана физичка активности и тровање такође узрокују стварање CP (Bailey и сар. 1993; Đukić, 2008).

2.4.2.2.2. *Механизам деловања слободних радикала*

Услед тежње да спаре неспарен(е) електрон(е), СР понашају се као снажни електрофили, односно јаки оксидациони агенси. Једном продукован слободни радикал (фаза иницијације) може изазвати низ ланчаних реакција (фаза пропагације) реагујући са другим мање реактивним врстама. Слободно-радикалски интермедијати који настају у ланчаној реакцији, имају у принципу дужи полуживот и већи потенцијал за оштећење ћелија (Ђорђевић и сар. 2000). У реакцији са супстратом (нпр. биомолекул) односно дономом електрона, СР се редукују и губе карактер СР, а супстрат се оксидише и постаје СР друге генерације тзв. секундарни СР и отпочиње ланац радикалских реакција. Слободно-радикалски поход лимитира фаза терминације у којој се слободни радикали неутралишу помоћу неензимских антиоксиданаса, ензимским механизмима или у реакцији једних са другима. Иако је већина радикала органске природе, могуће је формирање и неорганских (као што је супероксид анијон радикал) (Ђукић, 2008).

2.4.2.2.3. *Реактивне врсте кисеоника (ROS)*

Реактивне врсте кисеоника (ROS) представљају скуп врло реактивних метаболита насталих из молекулског кисеоника (Mimić-Oka, 1999). У свом саставу садрже атом(е) кисеоника и поседују већу реактивност од кисеоника у основном молекулском стању (Hu и сар. 2001). У ту групу спадају:

Супероксид анијон радикала ($O_2^{\cdot-}$) (настаје редукцијом једног електрона молекула кисеоника, растворљивост у мастима му је ограничена, те делује на месту стварања; у киселој средини веже протон и настаје још реактивнији перхидроксилни радикал ($HO_2^{\cdot-}$); спонтано, али и уз помоћ супероксид дисмутазе (SOD) као и водоникових јона, преводи се у водоник-пероксид),

Хидроксил радикала (HO^{\cdot}) (хемијски најреактивнији кисеоников радикал и најодговорнији за цитотоксичне ефекте кисеоника; настаје Fentonovom и Haber-Weissovom реакцијом, раскидањем O – O везе у молекулу водоник пероксида, под утицајем топлоте или зрачења) (Halliwell и Gutteridge 1990),

Водоник-пероксид (H_2O_2) (најстабилнији и најмање реактиван интермедијер редукције кисеоника; иако није радикал јер нема неспарених електрона, он је оксиданс који у присуству прелазних метала, (Fe^{2+}) и (Cu^+), може прихватити један електрон стварајући врло токсичан *хидроксилни радикал*; растворљив је у мастима, па може деловати на удаљеним местима од његовог стварања),

реактивни (синглет) кисеоник ($^1\text{O}_2$) (форма молекулског кисеоника у којој су електрони у задњој хибридној орбитали ексцитирани; настаје током фотохемијских и термичких реакција),

хипохлорна киселина (HOCl) и

озон (O_3) који такође узрокују оксидацијско оштећење ћелијских структура (Halliwell и Gutteridge 1989).

Митохондрије су главно место стварања слободних радикала кисеоника у ћелији, где највећи део ROS-ових једињења бива произведен кроз грешке у трансферу електрона унутар комплекса I (NADH дехидрогеназа) и комплекса III (цитохром $b\text{-c}_1$ комплекс). Ниво производње ROS-а драматично расте у случају застоја у транспортном ланцу и што више ROS-а бива створено, утолико више времена електрон проводи у оквиру датог комплекса. Гомилањем ROS-а унутар митохондрија настаје оштећење митохондријске DNK (mtDNK) (Barja, 2004, 2007; Barros и сар. 2004).

Реактивне врсте кисеоника индукују оштећења ћелија интеракцијом са макромолекулама, протеинима и нуклеинским киселинама и њиховом ковалентном модификацијом, процесом липидне пероксидације, као и стварањем нерадикалских продуката који делују на различите структуре у ћелији (Dargel, 1992; Yasui и Sakurai, 2000). Током фагоцитозе се у макрофагима, неутрофилима и еозинофилима континуирано стварају ROS-ова једињења (Babior, 2000; Marks и сар. 1996; Morel и сар. 1991), која потичу од снажног оксидативног метаболизма, “оксидативног праска“ при чему настају супероксид, водоник-пероксид, хидроксилни радикал, хипохлорна киселина и азотов оксид. Водоник-пероксид може створити друге радикале попут хипохлорне киселине и снажан је оксиданс и антимикуробни агенс (Gutteridge, 1994).

2.4.2.2.4. Оксидациони стрес (ОС)

У аеробним организмима, реактивни радикали кисеоника, како у условима хиперпродукције, тако и у условима неадекватне елиминације врше оксидациони атак (оксидациони стрес) и доводе до промене редокс система у ћелији, као и промене флуидности ћелијских мембрана (Papa и Skulachev, 1997; Skulachev, 2004; Harman, 2006). У равнотежним условима, слободни радикали разграђени су ћелијским антиоксидансима, уз помоћ ензима као што су супероксид дизмутаза (SOD), каталазе и глутатион пероксидазе или неензимски уз помоћ глутатиона (GSH) (Anderson 1996; Halliwell, 1994). Од прооксидационо-антиоксидационе равнотеже у организму зависи његово физиолошко стање и виталност. Постепеним старењем, ова равнотежа се све теже одржава, систем антиоксидационе заштите је све мање ефикасан, тако да

интензивнија продукција реактивних врста кисеоника изазива све обимнија оштећења организма (Ames и сар. 1993).

У патолошким процесима повећана је концентрација и активност слободних радикала. Овај догађај је посредован екстрацелуларним отпуштањем ROS-а из гранулоцита, активацијом ксантин оксидазе и фосфолипазе, променом електрона у транспортном ланцу митохондрија итд. Размера оштећења, насталог као последица ОС зависи од степена, механизма којим је изазван, трајања, као и од органског супстрата који је погођен. Тешки ОС узрокује тешка оштећења ћелијских структура, што на крају узрокује ћелијску смрт (Bergendi и сар. 1999).

2.4.2.2.5. Фотостарење и оксидациони стрес

Бројни подаци из савремене литературе говоре да одређени UV зраци Сунчеве светлости могу учествовати у оштећењу биомолекула, а тај утицај зависи од интензитета и таласне дужине UV зрака, биомолекула на које ово зрачење утиче, парцијалног притиска кисеоника, присуства хромофора, одбрамбеног система организма и механизма репарације (Ђukić, 2008).

У случају нејонизујућег зрачења долази до стварања слободних радикала уколико ово зрачење има вишак унутрашње енергије, која ће изазвати хомолитичко цепање ковалентних веза. Код радијације са ниском унутрашњом енергијом (нпр. видљиво зрачење), слободни радикали се у биолошком систему могу произвести уколико је истовремено присутна фотосензибилизујућа супстанца (Slater, 1984).

UV зрачење, заједно с инфрацрвеним и видљивим зрачењем чини спектар Сунчевог зрачења (Pfeifer и сар. 2005). Земљин озонски омотач зауставља зраке таласне дужине краће од 300 nm тако да своје дејство на површини Земље испољавају UVA и UVB зрачење. Највећи део зрачења које стиже на површину Земље чини дуготаласно UVA зрачење, док свега 1-5% UV зрачења чини UVB зрачење. С обзиром на оштећење озонског омотача продирање UVB зрачења до земљине површине је олакшано, а самим тим је и његов ефекат карциногенезе израженији (De Fabo, 2005). Процењује се да смањење озонског омотача од 1% повећава смртност од меланом за 1-2% (Kripke, 1988).

Највећи део UVB зрачења које стиже до коже (70%) апсорбује *Stratum corneum*, 20% продире у дубље виталне слојеве епидермиса, а само 10% стиже до папиларног дермиса. Насупрот овоме, UVA зрачење се делом апсорбује на нивоу епидермиса, али 20-30% стиже у дубље слојеве дермиса. Студије које су процењивале утицај зрачења различитих таласних дужина на ћелију откриле су да је UVB зрачење цитотоксичније

и мутагеније од UVA зрачења (Tomas, 2009). У кожи која је стално изложена дејству UV зрака долази до убрзане продукције и гомилања ROS-а, јер су антиоксидативни механизми ограничених капацитета (Ames и сар. 1993). Обе врсте зрачења, UVB (Halliday и сар. 2005) и UVA доводе до генерисања ROS-а, мада су оксидативна оштећења првенствено резултат деловања UVA зрака (Kang и сар. 2003). Када се исцрпе антиоксидативни механизми, у ћелији настаје „оксидациони стрес“, који има значајну улогу у патогенези многих инфламаторних и малигних болести коже, кутаним аутоимунским болестима и фотостарењу коже (Bacharach-Buhles и сар. 1999; Callaghan и Wilhelm, 2008).

UVA зрачење доводи до липидне пероксидације (Tirache и Morliere, 1995), оксидативног оштећења које захвата ћелијске мембране, липопротеине и друге молекуле који садрже липиде. Липидна пероксидација смањује флуидност биолошких мембрана, што резултира појачаном пропустљивошћу за једновалентне и двовалентне јоне (Sorg и сар. 2006). Оштећење мембрана митохондрија доводи до смањења синтезе АТФ и повећане пропустљивости спољашње митохондријске мембране, са „цурењем“ *citohroma c* у цитозол и покретања процеса апоптозе. Фрагментацијом ланаца масних киселина до интермедијера, губи се интегритет мембрана, а руптура лизозомских мембрана, узрокује ослобађања хидролитичких ензима који даље оштећују ћелију (Dargel, 1992; Kumar и сар. 2010). Као крајњи производ липидне пероксидације, настаје малондиалдехид (MDA) који се сматра главним извором липофусцина, тзв. “пигмента хабања” који је маркер оксидативног оштећења ћелије које се последње одиграло (Scott, 1995; Brunk и сар. 2002; Kumar и сар. 2010). Мутагени и канцерогени ефекти MDA најчешће се везују за његову могућност интеракције са DNK (Williams и сар. 2014).

Бројна истраживања показују да су последице фотооксидације протеина њихова фрагментација или формирање агрегата велике молекулске масе, што води ка биофизичким и биохемијским променама у протеинима: повећава се осетљивост оксидисаних протеина на протеолитичке ензиме, мењају се механичка својства, настају промене у протеинској конформацији, повећава се хидрофобност, дешавају се промене у везивању кофактора и металних јона у протеинима (Rocquet и Bonte, 2002). Оксидативно оштећење аминокиселина често доводи до настанка неких других аминокиселина, што утиче на функционалну активност самог протеина (Đukić, 2008).

Повећање ROS-а може да измени структуру и функцију многих гена директним оштећењем митохондријске и једарне DNK (Greinert и сар. 2000; Ouhtit и

Ananthaswamy, 2001; Laga и Murphy, 2009). Подручје од 254nm, UV радијације, доводи до стварања такозваних 6-4 фотопродуката, као и пиримидин димера (успостављање ковалентне везе између две пиримидинске базе). Уколико постоји инсуфицијенција DNK репарационог система, јављају се прекиди у структури хромозома, измене хроматинског материјала хомологих (сестринских) хромозома, реаранжирање хромозома, као и делеција хромозомског материјала (De Gruijl, 2002). UVA зрачење таласне дужине око 334 nm одговорно је за скоро целокупну оксидацију гуанина, и чешће је, него зрачење других таласних дужина, повезано са појавом малигнитета коже (Kvam и Tytrell, 1997). Приликом редупликације DNK, ензим DNK полимераза не препознаје 8-хидроксигуанин као гуанин него га замени за тимин. Последица тога је да се тај нуклеотид у редупликации спарује са аденином уместо с урацилом. Тиме настаје процес трансверзије у коме се пар нуклеотида GC промени у пар AT. Ипак, један од најзначајнијих ефеката оксидационог стреса је оштећење DNK које настаје кроз процес оксидације пуринских и пиримидинских база, првенствено гуанина и стварања 8-охо-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). Због промене грађе појединих нуклеотида унутар гена настаје мутација, а тиме смањена синтеза протеина или чак њен престанак (Cadet и сар. 2005; Pfeifer и сар. 2005; Cadet и сар. 2009).

Сматра се да су ефекти озона, X радијације и других егзогенних генератора слободних радикала на молекул DNK чешће индиректни, и то преко стварања првенствено малондиалдехида који интерагује са молекулима DNK, доводећи до мутација (Williams и сар. 2014).

Реактивне врсте кисеоника покрећу и низ других реакција унутар ћелија коже. Заједно са јонизујућим зрачењем (Janssen и сар. 1993), UV зрачењем (Devarу и сар. 1992), реактивни кисеоникови радикали, H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$ су одговорни за активацију AP-1 фактора транскрипције (Afaq и сар. 2005; Afaq, 2011).

Наиме, конститутивна активација површинских ћелијских рецептора, попут рецептора за епидермни фактор раста (EGFR) (engl. Epidermal Growth Factor Receptor), рецептора за интерлеукин 1 (IL-1R) и рецептора за фактор некрозе тумора (TNFR) (engl. Tumor necrosis factor receptor), који су окидачи интрацелуларне сигнализације, преко митогеном активираних протеин киназа MAPK (engl. Mitogen-activated protein kinase) коначно резултује нуклеарном транскрипцијом комплекса познатог као активатор протеин 1 (AP-1) и нуклеарни фактор-каппа В (NF-kB). Митогеном активирани протеин киназе (MAPK) су: p38 киназе, c-Jun аминокиселине

терминалне киназе (JNK) (engl. c-Jun amino-terminal kinase, позната као и стресом активирани протеин киназе (engl. stress-activated protein kinases (SAPKs)) и екстрацелуларним сигналом регулисане киназе (ERK) (engl. extracellular signal-regulated kinase) (Svobodova и сар. 2003; Laga и Murphy, 2009).

MAPK су укључене у ћелијску диференцијацију, пролиферацију и апоптозу, а AP-1 контролише експресију многих гена, укључујући гене који детерминишу синтезу колагеназа и трансформишућег фактора раста бета 2 (TGF- β_2) (Afaq и сар. 2005). Наиме, AP-1 инхибира ефекте TGF- β_2 , цитокина који стимулише производњу колагена, смањењем синтезе проколлагена (Quan и сар. 2002; Quan и сар. 2005; Kohl и сар. 2011). AP-1 у хуманој кожи доводи до стимулације и активације матриксних металопроотеиназа (MMPs) и то: интерстицијалне колагеназе (MMP-1), желатиназе А (MMP-2), стромелизин-1 (MMP-3) и 92 kDa желатиназе В (MMP-9) (Kim и сар. 2004; Wenk и сар. 2004; Fisher и сар. 2002; 2009; Brenneisen и сар. 2002; Ramos и сар. 2004; Wang и сар. 2008) које су одговорне за деградацију колагена (Fisher и сар. 1996; 1997; Rittie и сар. 2002; Chung и сар. 2001; Yarr и Gilchrist, 2007). Експресија MMPs-а јавља се у кератиноцитима и фибробластима (Herrmann и сар. 1993), мада истраживања показују да су кератиноцити главни извор MMPs-а које након синтезе, дифундују у дермис и тамо делују на компоненте екстрацелуларног матрикса (Knauper и сар. 1997; Overall, 2001; Brenneisen и сар. 2002; Quan и сар. 2009). У здравој кожи се налази веома мало MMPs-а, јер њихову активност модулишу ткивни инхибитори MMPs (TIMPs). ROS може инактивирати TIMPs и тако и индиректним путем довести до повећане синтезе MMPs и повећане разградње колагена (Ma и сар. 2001; Pillai и сар. 2005). Показано је да се под дејством UV зрака синтеза MMPs може повећати и до пет пута (Pillai и сар. 2005).

Транскрипциони фактор, NF- κ B (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) се такође активира дејством UVA зрака и стимулише продукцију проинфламаторних цитокина: (TNF)- α , IL-1, IL-6, и IL-8 (Basile и сар. 2003) од стране кератиноцита, који привлаче полиморфонуклеарне леукоците и макрофаге (Pourzand и Tytgell, 1999; Reelfs и сар. 2004), који су додатни извор MMPs-а. Из леукоцита се ослобађа MMP-8 (неутрофилна колагеназа) која додатно учествује у протеолизи колагена (Fisher и сар. 2001; Rijcken и сар. 2005; Hernandez-Pigeon и сар. 2006), док макрофаги ослобађају MMP-12 (макрофагну еластазу) која разлаже еластична влакана (Chung и сар. 2002). Такође се значајно модулише физиологија

осталих ћелијских типова који се налазе у кожи, укључујући фибробласте (Basile и сар. 2003).

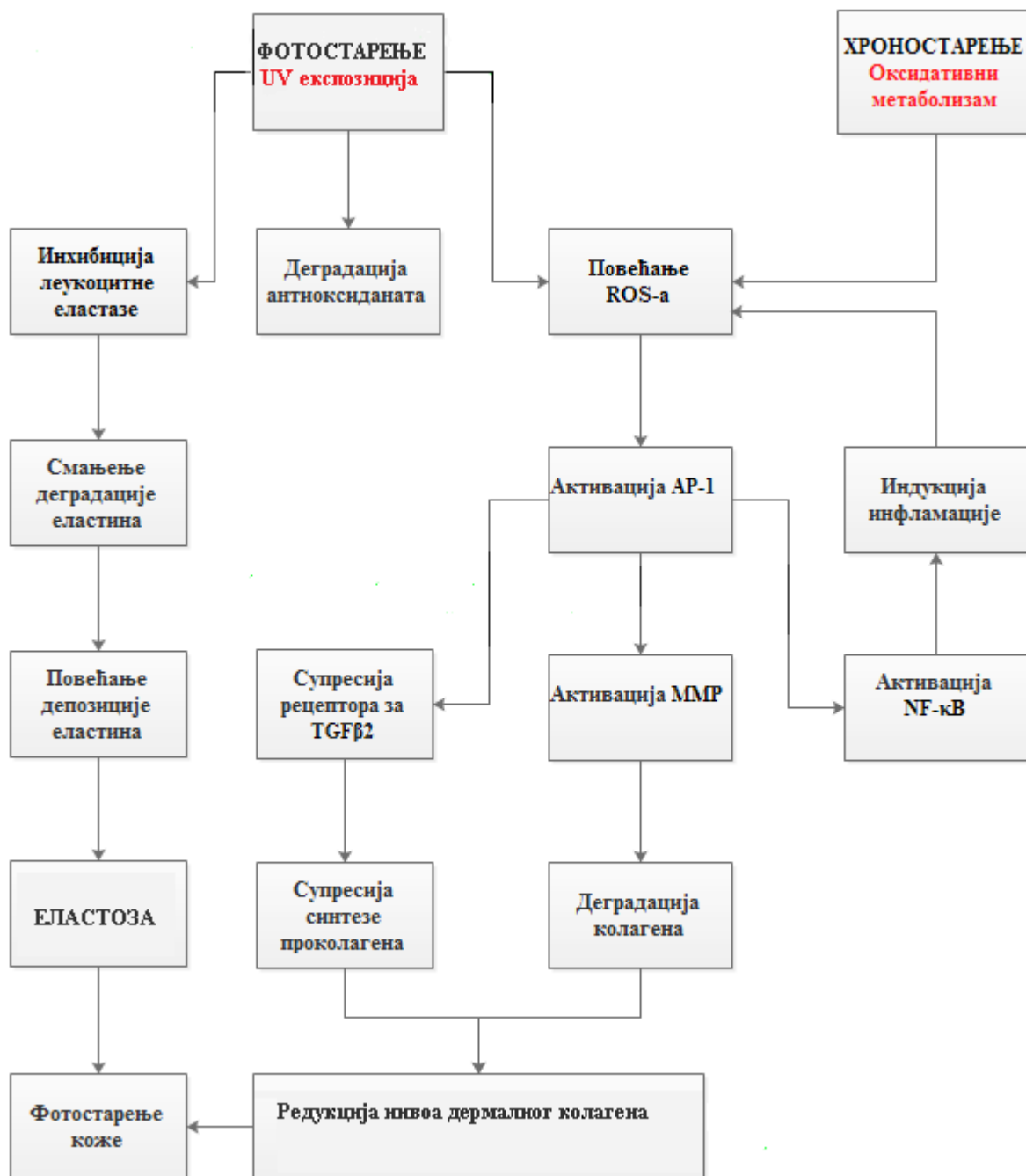
UVA зраци такође повећавају и активност хем-оксигеназе (HO-1), која катализује разградњу хема унутар гвожђа и биливердина, а смањују активност антиоксидативних ензима, супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (Evelson и сар. 1997).

Ослобађање ROS-а покреће апоптозу и инфилтрацију Т-ћелијама кроз повишену експресију Fas рецептора (CD95) на кератиноцитима који се везују за FasL (Fas ligand) на мембрани активисаних Т ћелија, што доводи до активације каспаза и ћелије уводи у апоптозу (Morita и сар. 1997; Aragane и сар. 1998). UVA зрачење узрокује тзв „мешану“ апоптозу, која подразумева непосредну апоптозу (настаје 0-4 часа након озрачивања, услед оштећења митохондријских мембрана) и одложену апоптозу (настаје после >20 часова, уз експресију апоптотичних протеина) (Godar и сар. 1999).

Реактивне врсте кисеоника индукују и оштећење митохондрија, метаболичких центара ћелија у којима се производи више од 90% енергије (Scheffler и сар. 2007; Wäster и сар. 2009). Оксидативно оштећење настаје и у митохондријској DNK која је неколико пута осетљивија на деловање слободних радикала од једарне DNK, јер не садржи заштитне хистонске протеине (Wei и Lee, 2002). Фотооштећена кожа показује већи број мутација mtDNK, него кожа која није излагана зрачењу (Berneburg и сар. 1997). Мутације mtDNK су и до 50 пута чешће него на нуклеинској DNK, а њима је нарочито подложна секвенца (4977-bp), која учествује у респираторном ланцу. Ова секвенца је избрисана (*тзв. често брисање*) у многим ткивима узетим од старијих донора, као и код многих дегенеративних болести (Scheffler и сар. 2007). Брисање је 10 пута чешће у фотооштећеној кожи него у кожи заштићеној од сунца, што узрокује смањење функције митохондрија и повећано гомилање ROS-а (Birch-Machin и сар. 1998). Такође, запажене су честе мутације на mtDNK у фибробластима који су *in vitro* излагани сублеталним дозама UV зрачења, као и на фибробластима коже која је била заштићена од сунца, када се накнадно изложе физиолошким дозама UVA зрачења (Berneburg и сар. 2000; Gonzales и сар. 2005; Yaag и Gilcrest, 2007). Експериментом са мишевима код којих је мутацијом уништена егзонуклеазна активност mtDNK полимеразе γ , неорходне за исправљање грешака DNK полимеразе, доказано је да су ови мишеви старили много брже (Trifunović и сар. 2004). Wallace и сар. (2006) су у свом истраживању потврдила да митохондрије старијих организама акумулирају већу количину мутација, а да су поједине од тих мутација повезане са раним старењем код људи (Wallace и сар. 2006). Масивна оксидативна оштећења mtDNK која се не могу

репарирати, доводе до смањења или губитка њихове функције и покретања процеса апоптозе која је под контролом чланова фамилије Bcl-2 протеина (Voeikov и сар. 2006; Kumar и сар. 2010).

Mehta и Fitzpatrick (2007) наводе да је заједнички пут којим иду фото и хроностарење, повећање количине реактивних врста кисеоника, као и следствена активација AP-1, што је представљено на шеми 1.



Шема. 1. Биохемијски путеви интринзичког и екстринзичког старења коже (Mehta и Fitzpatrick, 2007)

2.5. Хистолошке карактеристике старења коже

2.5.1. Хистолошке карактеристике хронолошког старења коже

Хистолошке промене које карактеришу инволутивно старење, резултат су редукције пролиферативног капацитета, целуларне сенесценце, као и редукције биосинтетске активности ћелија коже, уз фибробластно повећање продукције деградирајућих ензима, као што су металопротеиназе матрикса (Jenkins, 2002; Verneburg и сар. 2000; Rabe и сар. 2006). Прогресивно истањење епидерма, губитак еластичне мреже у дерму и дезорјентација колагених влакана су неспецифичне структурне промене, настале као последица хронолошког старења. Клиничке манифестације ових промена запажају се у виду појаве стањења коже, губитка њене еластичности и присуству финих бора. Иако су и структурне и клиничке промене неспецифичне, не смеју се занемарити јер представљају погодну основу за развој озбиљних патолошких промена на кожи, укључујући и малигне лезије (Mladenović и Pavlović, 2000).

У литератури не постоји сагласност о промени дебљине епидермиса током старења. Једна група аутора саопштава да је нормално или интринзичко старење праћено атрофијом епидерма, који се временом истањује (смањује се број живих слојева) делом због смањења броја кератиноцита, а делом због смањења њихове запремине (Lavker 1979; Lock-Andersen и сар. 1997; Levakov и сар. 2012), док друга група аутора у својим истраживањима није потврдила узрочну зависност између старења и стањења епидермиса (Whitton и Overall, 1973; Sandby-Moller и сар. 2003). Укупна дебљина епидерма се смањује, највише као последица смањења дебљине спинозног слоја (Engelke, 1997; Wulf и сар. 2004), мада неки аутори сматрају да је атрофија епидерма изражена општим стањивањем и губитком дубоких гребенова, што доводи до заравњивања дермно-епидермне границе (Gilchrest, 1993; 1996; Engelke, 1997). Истражујући хистолошке карактеристике, коже која је промењена борама, показано је да се у дну бора, хронолошки остареле коже, запажа стањење спинозног слоја, насупрот бочним ивицама бора, где то смањење није евидентирано. Ова студија је показала да се у дну бора у гранулозном слоју кератиноцита, налази мање кератохијалинских гранула, него на бочним странама бора (Contet-Audonneau и сар. 1999).

Базални кератиноцити, хронолошки остареле коже, показују морфолошке промене које могу да се опишу као дифузна епидермна дисплазија-хетерогеност у величини, облику и пријемчивости за хистолошке боје (West, 1994). Такође се зна, да се промене епидермиса не догађају због смањеног броја митоза базалних кератиноцита. Напротив, сматра се да је број митоза повећан, али је животни век ћелија смањен готово на половину (Marks, 1992; Gilchrest, 1993). Међутим, има и ставова по којима је митотска активност у ћелијама базалног слоја редукована (Zouboulis и Makrantonaki, 2011), а време транзиције кератиноцита од базалног слоја до корнеалног слоја продужено, па се уобичајени 28-дневни „turnover time“ кератиноцита повећава апроксимативно 30% до 50% у 80-тим годинама (Yaar и Gilchrest, 2001; Gilhar и сар. 2004; Wulf и сар. 2004). Са старењем, отпорност кератиноцита на апоптозу расте, а акумулација промењених DNK и протеина у кератиноцитима, представљају погодан терен за развој карциногенезе (Gilchrest и сар. 1982; Yaar и Gilchrest, 2001).

Једна од најупадљивијих промена у хронолошком старењу коже уочава се у пределу дермно-епидермног споја у смислу његовог заравњења и задебљања ламине дензе. Заравњење је узроковано смањењем броја дермних папила, односно епидермних пречки за преко 50% у односу на јединицу површине коже (Gilchrest 1993;1996; West, 1994; Marks 1992; Stuttgarten 1996; Al-Habib и Kadhim, 2012). Једна студија је анализирао кожу абдомена, мерећи површину дермно-епидермног споја и регистровала смањење површине са 2.64 mm^2 , особа од 21 до 40 година на 1.90 mm^2 особа, старости од 61 до 80 година (Katzberg, 1985). Такође је саопштено, да базални кератиноцити младих особа поседују бројне цитоплазматске продужетке којима продиру у дерм, док остарелим базалним епидермним ћелијама ови продужеци упадљиво недостају (West, 1994), нарочито после 6-те декаде (Humbert и сар. 2005). Заравњење граничне линије смањује отпор према тензијама и води ка ослабљеној адхезији епидерма и његовом одвајању услед мањих повреда, а описане промене цитоплазматских продужетака кератиноцита, одговорне су за смањење епидермно-дермне адхезије и наглашенију склоност овако измењене коже ка развоју була после мањих повреда или у склопу дерматоза, као што су *Lichen planus* или *Lichen sclerosus* (Gilchrest 1993;1996; West, 1994).

Дебљина корнеалног слоја није редукована у старости. Са старењем се линеарно повећавају просечна површина и запремина корнеоцита, што са друге

странице значи смањење међућелијских простора по јединици запремине корнеалног слоја (Marks, 1992).

Током старења Лангерхансове ћелије се могу бројно смањити чак до 50% (Wulf и сар. 2004). Ова појава је посебно наглашена на фотоекспонираној кожи. Смањење броја Лангерхансових ћелија један је од узрока ослабљеног имунског одговора у кожи и, између осталог, повећаног ризика од малигне трансформације кератиноцита (Gilchrest, 1993;1996).

У епидерму старијих особа евидентирано је смањење броја меланоцита и Меркелових ћелија (West, 1994; Gilchrest, 1993; 1996; Stuttgen, 1996). Број меланоцита смањује се за 8-20% сваких десет година после 30. године живота и мањи је на фотоекспонираној кожи (Gilchrest, 1993; West, 1994; Tobin и Paus, 2001). Код старијих особа меланоцити су функционално ослабљени, неправилно распоређени и продукују неправилну пигментацију након излагања Сунцу. Последица тога је смањена способност пигментације после излагања Сунчевој светлости, што са своје стране повећава изложеност базалних кератиноцита UV зрацима и вероватноћу настанка карцинома базалних ћелија (Gilchrest, 1993). Парадоксално, у остарелој кожи присутна је тенденција преосталих меланоцита ка фокалној пролиферацији и образовању лентигозних макула (*Lentigo senile*). Појединачни меланоцити већи су и морфолошки хетерогенији него у кожи младих особа (West, 1994). Смањење броја и функције меланоцита, повезано је и са појавом оседлости (Gibson, 2004).

За разлику од епидерма, дерм трпи израженије промене у процесу старења коже. Хистолошке промене у дерму су углавном одговорне за изглед остареле коже, њену нееластичност, млитавост и набораност. Најупадљивије промене су смањење дебљине дерма, смањење количине и дезинтеграција колагених и еластичних влакана, дезорганизација и смањење дермног матрикса, смањена васкуларизованост и хипоцелуларност (Gilchrest 1993;1996; West, 1994; Chung и сар. 2001; Fisher и сар. 2009). Атрофија дерма је последица смањене синтезе колагена, услед редукције фибробласта (Marks 1992; Gilchrest 1993;1996; West, 1994; Goihman-Yahr, 1996). Продукција колагена код старих људи (преко 80 година) у поређењу са кожом младих људи (18 до 29 година) снижена је на ниво од приближно 75% (Varani, 2006), док је ниво деградације колагена повећан на 75% (Fisher и сар. 2002). Посматрајући паралелно снижење садржаја колагена тип I и колагена тип III, утврђено је да долази до промене у квалитативном односу колагених влакана у корист колагена тип III, као и да та промена корелира са узрастом човека (Смирнова, 2004).

Код хронолошки остареле коже приметан је губитак фасцикуларних колагених фибрила које замењују влакна дезорганизованог и грануларног изгледа (West, 1994). Садржај колагена смањује се приближно 1% годишње после пубертета, а пошто колаген кожи даје чврстину, губитак интегритета колагених влакана објашњава склоност остареле коже ка цепању и при умереној физичкој сили (Ghersetich и сар. 1994). Занимљиво је да се у процесу старења укупна количина хијалуронске киселине значајно не мења, али је установљена промена њене дистрибуције унутар коже, повећање ткивно-везане фракције и промена молекулске масе, а са тим и промена количине везане воде (Manuskiatti и Maibach, 1996).

У морфогенези и динамичном преуређењу дерма централну улогу имају фибробласти. Фибробласт је главна ћелија везивног ткива („*master cell*“) (Lever и Schaumburg-Lever, 1983). У стању мировања фибробласти се само повремено деле и синтетишу мале количине протеолизних ензима. Реагујући на различите стимулусе, они мењају свој фенотип, улазе у ћелијски циклус и повећавају продукцију протеолизних ензима у виду проензимске форме (Uitto и Christiano, 1993; West, 1994). Проензими MMPs-а локално се активишу и започиње деструкција ванћелијског матрикса. Колагеназа је кључни ензим у деградацији колагена. Она започиње његову дигестију, „одмотава“ молекул колагена, након чега ензим желатиназа наставља даље разарање (Uitto и Christiano, 1993; Goldberg, 1986; West, 1994). Стромелизин 1 и 2 делују на фибронектин, протеин језгра протеогликана, нехеликсни део еластина, колаген II, IV и IX, ламинин, протеогликане I и III и желатин (Murphy и сар. 1992; West, 1994). Када се упореде фибробласти коже старе и младе особе, запажа се да су остареле ћелије, не само изгубиле моћ пролиферацијског одговора, у присуству серумских фактора раста, већ и способност функције модулације ванћелијског матрикса. Међутим, остарели фибробласти нису блокирани у правом стању мировања, већ се налазе у стадијуму делимичне активације. Промене фибробласта током старења утичу на повећање експресије матриксних металопротеиназа, ензима укључених у процес деградације колагених влакана и смањење експресије њихових инхибитора (Ghersetich, 1994; Varani и сар. 2000). Крајњи резултат ове неравнотеже је повећана деструкција ванћелијског матрикса у дерму, стање које се редовно запажа у остарелој кожи (West, 1994). При старењу се, дакле, смањује број, мења морфологија, пролиферативни потенцијал и функционална активност фибробласта (Fisher и сар. 2002; 2008; Sorrell и Caplan, 2009), с тим што је најкарактеристичнија промена везана за пролиферативну и биосинтетску активност (Jenkins, 2002).

Еластин чини свега 2% од укупних протеина коже, али је од пресудног значаја за њену еластичност (Uitto и Christiano, 1993; Uitto, 2008). У току старења долази до прогресивна дезинтеграције еластичних влакана у папиларном дерму, тако да је после 70. године живота овим процесом захваћена већина влакана (West, 1994; Zouboulis и Boschnakow, 2001). Смањен је број и пречник еластичних влакана која изгледају фрагментовано, посебно у дермно-епидермном региону са „чупавим“ крајевима који упућују на деловање еластолизних ензима (Gilchrest, 1993; West, 1994). Насупрот папиларном, у ретикуларном слоју дерма, током старења, повећава се број и ширина еластичних влакана. Она постају груба, фрагментована и еластозно измењена (Lavker и сар. 1989). Постоје, такође, наглашене фокалне неправилности у распореду еластичних влакана. Слични, али далеко изразитији поремећаји налазе се код соларног оштећења коже. Дакле, карактеристика хронолошког старења коже је прогресивна аутодеструкција еластичних влакана која започиње после 30. године живота и постаје изражена после 70. године (West, 1994).

Васкуларизација коже је такође редукована током интринзичког старења, при чему су артериовенске анастомозе дермних папила, посебно захваћене (Petrović, 2001). Промене се испољавају у виду стањења зидова крвних судова, чија дебљина је приближно 0,5-1 μm (нормално од 2-3 μm) (Braverman, 2000). Број капиларних петљи субпапиларног плексуса се такође смањује са годинама, а сам плексус је измењен, вијугав, издужен, дезорганизован и проширен (Li и сар. 2006).

Са годинама се смањује број и секрецијска функција екриних жлезда (Gilchrest и сар. 1993; Zouboulis и Makrantonaki, 2011), а долази до хиперплазије лојних жлезда, уз истовремено смањење продукције лоја, приближно за 20-30% сваких 10 година после пубертета (Gilchrest, 1993;1996; West, 1994; Zouboulis и Makrantonaki, 2011). Значајне промене у процесу старења запажају се и на длакама (West, 1994). У остарелој кожи смањена је чулна перцепција (Gilchrest, 1993).

2.5.2. Хистолошке карактеристике фотостарења

Изложеност UV зрачењу изазива акутне и хроничне ефекте на кожи. У акутне ефекте спадају еритем, UV-индукована инфламација (опекотине) и тамњење коже, а у хроничне, фотостарење и кожни малигнитети (Ichihashi и сар. 2003). UVB зрачење индукује промене углавном на епидермалном нивоу, где се и апсорбује велика количина овог зрачења, док UVA продире дубље у дермис и оштећује и дермис и

епидермис. UV зраци изазивају оштећења на кератиноцитима, меланоцитима и дермалној строми-фиброзном ткиву (колагену и еластину), као и на крвним судовима у кожи (Ichihashi, 2009). Кожа постаје сува, избраздана, смежурана, нееластична, атрофична, телангиектазна, са повећаном фрагилношћу капилара, а јављају се и разне форме ирегуларне пигментације (дифузна смеђа пигментација, пеге, лентигинес, меланоцитни невуси). Старост, пол, географски положај и фототип коже могу утицати на израженост фотостарења (Malvy и сар. 2000). Поред клиничких карактеристика, патохистолошка евалуација коже је важна метода за процену степена оштећења у фотостарењу (Wurm и сар. 2012).

Хистолошке промене фотоостареле коже су израженије у односу на хронолошки остарелу кожу, а промене се виде и у епидермису и дермису (Rigel и сар. 2006).

На почетку UV зрачење у кожи индукује ослобађање цитокина и фактора раста, који доводе до хиперплазије кератиноцита, појаве акантозе и задебљања епидермиса. Епидерм хронично изложен Сунчевом зрачењу показује променљиву дебљину при чему акантоза преовлађује у раним стадијумима актиничног оштећења, док у најтежим облицима, атрофија постаје доминантан клинички и хистолошки знак (Rigel и сар. 2006). Такође се повећава и пролиферацијски капацитет епидерма, са знатно више кератиноцита у ћелијском циклусу у поређењу са кожом неизлаганом Сунцу. Изражена је дисплазија и дискератоза ћелија (Lipozenčić, 2004; Kondo, 2000), а могу се појавити и атипичне *Sun burn cells* (SBCs). Рожаста слој може да буде задебљао, компактан или растресит (Karadaglić, 2000). Број меланоцита у целини је смањен (леукодерма) уз фокалну хиперплазију која је основ појаве соларног лентига (Lever, 2005). Дермно-епидермна граница је заравњена, са губитком епидермних пречки (Rigel и сар. 2006), задебљањем ламине дензе и смањењем количине колагена типа VII (Gilchrest, 1996; Craven и сар. 1997; Contet-Audonneau и сар. 1999; Varani и сар. 2004). Број и функција Лангерхансових ћелија значајно су смањени, што има коренит утицај на локални имунски одговор и склоност развоју малигнитета коже (Fagage и сар. 2010).

Степен оштећења дермиса зависи од количине UV експозитуре (Berneburg и сар. 2000). У кожи хронично изложеној Сунчевом зрачењу долази до соларне дегенерације, код које су промене углавном ограничене на горњу трећину дерма и која се не види код хронолошког старења (Berneburg и сар. 2000). Она се манифестује у виду соларне еластозе и базофилне дегенерације колагена. Соларна еластоza је главна

хистолошка карактеристика фотостарења коже. Бојењем, методама за еластична ткива, се могу видети накупине дебелих испреплетаних влакана које се називају еластозним материјалом (Ma и сар. 2001). Еластин садржи мању количину глутаминске киселине и лизина, а електронском микроскопијом се види дезорганизована и покидана мрежа еластичних влакана. Напредовањем процеса долази до хомогенизације овако оштећене мреже еластичних влакана (Farage и сар. 2010).

Еластин, заправо показује два патолошка феномена која су повезана са UV-експозицијом. Елафин, молекул пронађен код актинички остареле коже везивањем за еластин и формирањем елафин-еластин комплекса инхибира деловање еластазе и на тај начин онемогућава ефикасну деградацију еластичних влакана, доводећи до њихове акумулације у горњем и средишњем дермису (Muto и сар. 2007). Ова абнормална влакна имају смањену еластичност, а сама еластична мрежа је лошијег квалитета и организације у односу на нормалну еластинску продукцију (Bernstein и сар. 1997). Друго, активност еластазе индукована UV зрачењем, вероватно индиректно, подстиче синтезу еластина, која се догађа након ослобађања продукта разарања еластичних влакана. Када мере заштите, као што су елафин или антилеукопротеиназа SLPI (engl. skin derived antileukoproteinase) закажу, претерана активност еластазе не може бити контролисана (Schalkwijk, 2007). Саопштено је да фибробластна еластаза у кожи има есенцијалну улогу у дегенерацији и/или извитоперености еластичних влакана, насталих деловањем кумулативне UVB ирадијације (Farage и сар. 2010). Еластозни материјал је од епидерма одвојен јасно дефинисаном *grenz* зоном, у којој су присутна колагена влакна, са или без еластичних влакана (Tsukahara и сар. 2001).

У екстринзичком старењу, настају дезорганизована колагена влакна. Нивои прекурсора, као и укрштених веза између колагена тип I и колагена тип III су редуковани и опада количина зрелог колагена (Fisher и сар. 2002). Смањена је и синтеза колагена, јер се смањује количина ензима лизил-хидроксилазе, који је неопходан за синтезу колагена. Због тога танки колагени фибрили, који су у младој кожи смештени готово паралелно са епидермокутаном границом, задебљавају због попречног везивања и умрежавања. Влакна због тога губе паралелност, очвршћавају и распоређују се неправилно (Farage и сар. 2010). Хистолошки, код базofilне дегенерације колагена у горњем дерму су снопови колагена замењени аморфним гранулираним материјалом. Овај материјал се хематоксилин-еозином боји слабо базofilно. Наведени слој је издвојен од слабо атрофичног епидерма једном уском

зоном нормалног колагена. Код коже хронично изложене Сунчевом зрачењу долази до повећања садржаја колагена типа III (Kligman и сар. 1989; Kligman, 1996; Fisher и сар. 1997; Ou-Yang и сар. 2009).

Степен оштећења коже који прати дуготрајну UV ирадијацију зависи и од фототипа коже. По Fitzpatrick-у, код људи постоји шест основних фототипова коже (Fitzpatrick, 1988). У светлијим комплексима, особа изразито светле пути са пегамма, светлих очију и косе (тип I и II) настају озбиљније дегенеративне промене у односу на типове III и IV, особа тамније пути, смеђе косе и очију, код којих меланозоми горњег епидермалног слоја служе као релативно добра UVA и UVB заштита (Fitzpatrick, 1988; Baumann, 2009).

Бројне студије саопштавају да се гликозаминогликани, а посебно хијалуронска киселина смањују у фотостарењу, а повећава протеогликан хондроитин сулфат (Farage и сар. 2010). За метаболизам хијалуронске киселине одговорни су ензими хијалуронидазе (engl. Hial) (Jenkins и сар. 2004), али се данас мало зна о променама њиховог метаболизма у фотостарењу. Претпоставља се да поред UV- индуковане деградације хијалуронске киселине, активношћу хијалуронидаза, долази и до смањене синтезе хијалуронске киселине, што резултира њеном смањеном количином у кожи, током процеса фотостарења (Dai и сар. 2007).

Крвни судови дерма показују знакове активације ендотелних ћелија, задебљање базалне мембране, дилатацију и губитка потпоре од стране околног везивног ткива, што има за последицу склоност крварењу и слабију перфузију ткива (Baumann, 2009). У почетку задебљали, зидови крвних судова дерма, касније постају танки и њихов број се прогресивно смањује. Крвни судови дерма се увећавају и постају тортуозни, губе везу са околним везивним ткивом, постају фрагилни, а ендотелне ћелије показују повећану експресију интерцелуларног адхезионог молекула 1 (ICAM-1) (engl. Inter-Cellular Adhesion Molecule). Долази и до стимулације ангиогенезе кроз појачану експресију VEGF-a (Yano и сар. 2005), као и појаве хроничног запаљења са периваскуларним инфилтратом сачињеним претежно од мастоцита, лимфоцита и макрофага (Kligman, 1996). Међутим, фотостарење коже са годинама доводи до редукције кутане микроваскулатуре, кроз смањење густине и величине крвних судова, што резултира смањењем температуре и исхрањеност коже (Kelly и сар. 1995) (Chung и сар. 2002; Chung и Eun, 2007; Farage и сар. 2010).

2.5.3. UV и карциногенеза

Према досадашњим сазнањима најјаче карциногено дејство има UVB зрачење, које је цитотоксичније и мутагеније од UVA зрачења (Tomas, 2009). Док UVB зрачење бива апсорбовано директно од DNK и пре свега доводи до структуралних оштећења DNK, UVA зрачење продире дубље у дермис и условљава индиректно оштећење DNK преко различитих форми слободних радикала кисеоника, чије формирање индукује (Fisher и сар. 2002; Sander и сар. 2004). Апсорбовано зрачење узрокује оштећење хелијске DNK, које уколико се не коригује репарацијским механизмима може да покрене пут онкогенезе и трансформације ћелије у правцу малигнитета. UVB зрачење узрокује два типа оштећења DNK: 6-4 фотопродукте који настају између суседних резидуа пиримидина (64PP) и пиримидинске или циклобутанске димере (CPD), који карактеристично настају између суседног тимина (T) и цитозина (C) (You и сар. 2001). Оба типа промена могу да услове генетске мутације као што су C→T или CC→TT транзиције. Транзиције CC→TT (engl. *UVR fingerprint mutation*) су једно од најкарактеристичнијих обележја UV зрачењем индукованог мутагеног ефекта (Cleaver и сар. 2002; Halliday и сар. 2005). Студије указују на то да преко 50% базоцелуларних тумора (BCC) и сквамозелуларних тумора (SCC) има ову мутацију (Ziegler и сар. 1993), као и да се у највећем броју случајева (BCC) јавља на деловима коже изложеној Сунчевим (UV) зрацима, у региону главе и врата (Tilli и сар. 2005).

Базоцелуларни карцином може да се јави већ у трећој деценији живота, али је то, пре свега, болест зрелог и старијег животног доба. Свега 5-15% оболелих су особе између 20 и 40 година, а 70% оболелих чине особе старије од 70 година (Chung, 2012). Новији резултати истраживања говоре да су детињство и адолесценција критични периоди за каснији развој малигних карцинома коже јер се у том животном добу апсорбује до 80% UV зрака, док се осталих 20% апсорбује у осталим периодима живота. Најновија истраживања показују пораст инциденце BCC -а за 3-8% годишње, широм света (Massari и сар. 2007).

Неколико епидемиолошких студија показало је да инциденца BCC-а више повезана с повременим, интензивним излагањем Сунцу и излагањем у току детињства, праћеним болним опекотинама. Кохортна студија, спроведена међу 966 испитаника (Kennedy и сар. 2003) анализира је факторе средине и генетске факторе ризика за карцином коже и показала повезаност болних опекотина од Сунца које су се јављале пре двадесете године живота са сквамозелуларним и базоцелуларним

карциномом, као и са актиничном кератозом. Међутим, кумулативна изложеност Сунцу у току живота у вези је са сквамоцелуларним карциномом и актиничном кератозом (Wikonakal и Brash, 1999).

Осим мутагеног ефекта UV зрачење има и локално и системско имуносупресивно дејство, тако што смањује имунолошки надзор према вирусним антигенима и туморским ћелијама (Aubin, 2003). Уочено је да се након експозиције UV зрачењу функција Лангерхансових ћелија значајно ремети, што умањује њихову одбрамбену улогу у кожи. Студије на животињама указују на то да се зрачењем индукована имуносупресија може сматрати значајним фактором ризика за настанак малигних тумора коже. Раније се имуносупресивни ефекат углавном приписивао UVB зрачењу, да би новије студије указивале на чињеницу да UVA зрачење има снажније имуносупресивно дејство (Halliday и сар. 2011).

3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

У намери да се пронађу заједнички принципи интринзичког и соларног старења коже и уоче разлике, условљене другачијим механизмима и динамиком промена, кроз хистолошку, хистохемијску, имунохистохемијску и морфометријску студију, сходно општем циљу истраживања, постављени су следећи непосредни циљеви:

- Хистолошка анализа општих карактеристика грађе коже у испитиваним групама;
- Морфометријска студија структурних елемената коже у испитиваним групама:
 1. одређивање дебљине вијабилног епидермиса;
 2. одређивање дебљине корнеалног слоја епидермиса;
 3. одређивање дебљине дермиса;
 4. одређивање укупне дебљине коже;
 5. одређивање површине епидермно-дермног споја;
- Квантификација колагена и праћење начина организације унутар папиларног и ретикуларног слоја дермиса у испитиваним групама;
- Квантификација еластичних влакана и праћење начина организације унутар папиларног и ретикуларног слоја дермиса у испитиваним групама;

- Квантификовање степена васкуларизованости папиларног и ретикуларног слоја дермиса у испитиваним групама;
- Квантификовање величине простора који заузима основна супстанца екстрацелуларног матрикса, папиларног и ретикуларног слоја дермиса у испитиваним групама;
- Праћење дистрибуције мастоцита и њихове густине у дермису коже, у испитиваним групама;
- Праћење дистрибуције Лангерхансових ћелија у епителу коже у испитиваним групама;
- Праћење дистрибуције и бројности дендритичних ћелија у дерму коже у испитиваним групама;
- Праћење бројности меланоцита у епителу коже у испитиваним групама;
- Квантификовање количине меланина у епителу коже у испитиваним групама;
- Праћење дистрибуције и бројности макрофага, као ћелија урођеног имунитета, у испитиваним групама;
- Утврђивање особина експресије VEGF-а у дерму коже, у испитиваним групама;
- Утврђивање особина експресије виментина у дерму коже у испитиваним групама;
- Утврђивање особина експресије протеина-маркера апоптозе p53 у кератиноцитима коже испитиваних група;
- Компарација добијених вредности квантификованих особина интринзичког и соларног старења коже, да би се утврдиле сличности и разлике у морфолошким манифестацијама, узајамност ћелијско-ткивних интеракција (евентуално хистофизиолошким механизмима) који прате промену структуре органа у поменутих физиолошким и патолошким стањима.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

4.1.1. Узрасна дистрибуција

Материјал су чинили узорци коже 90 кадавера старости између 0 и 82 године. Материјал је узиман цилиндричном (*punch*) техником, са коже предње стране врата (фотоекспонирана регија), као и са предње стране трбуха (фотонеекспонирана регија). Узимано је по 4 mm коже у пречнику, уз минимално ремећење њеног интегритета, након што је макроскопски, инспекцијом, утврђено да не постоје ефлоресценце на кожи.

Узорци коже разврстани су у пет узрасних група:

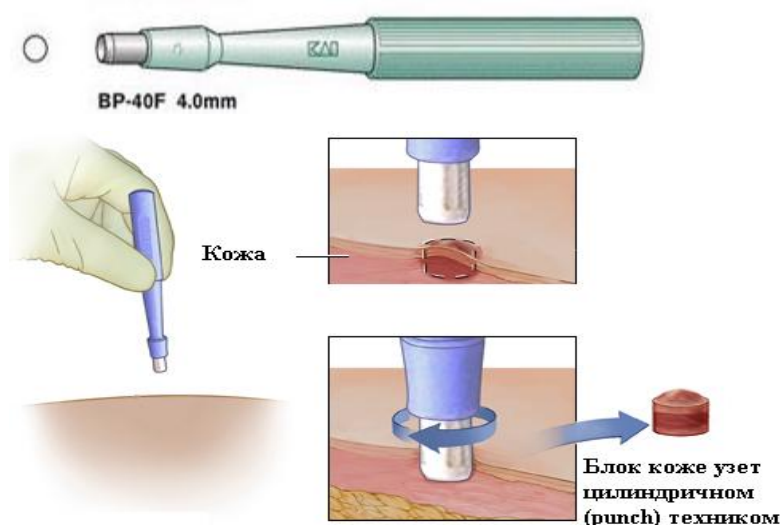
- а) Контролну групу (група 0), чинили су исечци коже фетуса и донешене новорођенчади, узети са кадавера на Институту за патологију Медицинског факултета у Нишу, код којих не постоји разлика у хистолошкој грађи између фотоекспонираних и фотонеекспонираних регија. Контролну групу чинило је 10 биопсија, од чега 6 мушког и 4 женског пола.
- б) Узорци коже особа узраста од 1. до 20. године живота (група 1) чинили су групу раног животног доба. Ова група обухватила је 20 биопсија, и то 12 мушког и 8 женског пола, просечне старости 9.95 ± 5.92 година. Мушкарци су имали просечну старост од 13.25 ± 5.31 година, а жене 5 ± 2.07 година.
- в) Узорци коже особа узраста од 21. до 40. године живота чинили су групу 2 (група средњег животног доба). Ова група обухватила је 20 биопсија коже, од којих 13 мушког и 7 женског пола. Просечна старост за целу групу је $33,1 \pm 4.95$ година. Мушкарци су имали просечно 34.84 ± 4.39 година, а жене 29.86 ± 4.49 година.
- г) Узорци коже особа узраста од 41. до 60. године живота (група позног животног доба) представљали су групу 3. Истраживањем је обухваћен 20 узорака, 11 мушког и 9 женског пола. Просечна старост у групи је била 53.50 ± 4.17 година. Мушкарци су имали просечно 54.91 ± 2.77 година, а жене 57.78 ± 5.07 година.
- д) Групу 4 (група најстаријих) чинили су узорци коже особа старијих од 60 година. Укупно је анализирано 20 узорака и то 8 мушког и 12 женског

пола. Просечна старост целе групе је била 74.90 ± 4.36 година, за мушкарце 77.75 ± 2.96 а за жене 73.00 ± 4.18 године.

Истраживање је обављено на Институту за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Приштини/Косовској Митровици, Институту за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Нишу, Институту за патологију Медицинског факултета у Приштини/Косовској Митровици, Институту за патологију КЦ-а Србије у Београду, Институту за патологију Медицинског факултета у Нишу, Институту за судску медицину у Нишу и Институту за судску медицину у Београду.

4.1.2. *Punch* техника узимања кожних блокова

Цилиндричном (*punch*) техником, са коже кадавера узимани су блокови ткива, пречника 4,0 mm и то са предње стране врата (на месту где почиње рутински или класични предњи рез код аутопсије), као и са предње стране трбуха (место где се предњи рез завршава). Од сваког кадавера узимана су по два ткивна исечака, увек на исти начин, уз готово неприметно ремећење интегритета коже, у складу са сагласношћу добијеном од стране Етичког комитета, Медицинског факултета у Косовској Митровици. Након ексцизије ткивни узорци су стављани у 10% пуферисани формалин. Бочице са формалином и узорцима обележаване су редним бројевима који одговарају редним бројевима кадавера, као и ознакама В или С, у зависности да ли је узорак кожа врата или стомака.



Сл. бр. 1. Биоптер марке KAI BP40F, пречника 4 mm, коришћен за узимање исечака коже и шематски приказ технике узимања кожних блокова

4.2. Методе

4.2.1. Хистолошке, хистохемијске и имунохистохемијске методе

Након фиксирања, ткивни исечци су стандардно дехидратисани у растућим концентрацијама алкохола, просветљени у ксилолу и калупљени у парафину. Од парафинских блокова прављени су серијски пресеци дебљине 5 микрометара на клизећем *Reichertovom* микротому. За општи увид у хистолошку структуру коже, као и одређивање дебљине коналног слоја, вијабилног епидерма и дерма и укупну дебљину коже, коришћени су исечци бојени рутинском, хематоксилин-еозин (HE) хистолошком техником (Тасић, 1994). HE бојењем су бојени и препарати на којима је одређивана површина дермно-епидермног споја. За приказивање колагена, крвних судова дерма и екстрацелуларног матрикса, коришћена је хистохемијска метода по *Van-Gieson*-у (Bancroft и Cook, 1984), за идентификацију мастоцита метода по *Spiceru*, *Toluidin blue* и *Giemsa* бојење (Cook, 1973), еластичних влакана методе: метода по *Spiceru*, модификовано *Aldehyd fuchsin* бојење (*Halmi* модификација *Гомори* методе) (McManus и Mowry, 1960) и за приказивање меланина хистохемијска метода *Masson Fontana* (Brown и Smoller, 2010).

За имунохистохемијску анализу парафински пресеци су депарафинисани и хидратисани преко ксилола и растућих концентрација алкохола. Активност ендогених пептидаза сузбијена је инкубацијом у 3% водоник-пероксиду у трајању од 5 минута, а демаскирање антигена извршено је петнаестоминутним кувањем у цитратном пуферу рН 6,0. Ткивни пресеци су затим инкубирани 1 час са панелом моноклонских антитела специфичних за CD1a (за Лангерхансове ћелије), CD68 (за макрофаге), поликлонским антителом S-100 за идентификацију зрелих дендритичних ћелија и меланоцита, p53 (показатељ мутације протеина p53), виментин (за фибробласте) и VEGF (показатељ ангиогенезе). Секундарно бојење вршено је китом LSAB2 (Dako, Denmark) на собној температури у трајању од 30 минута. Као хромоген коришћен је 3,3'-диаминобензидин (DAB), а за контрастно бојење хематоксилин (Sheibani и Tubbs, 1984).

Имунохистохемијски метод се заснива на реакцији антиген-антитело. Применом одговарајућих моноклоналних антитела, специфичних за одређене врсте рецептора у једру, цитоплазми или на мембрани нормалне или малигне ћелије, могућа је визуелизација комплекса антиген-антитело, а самим тим и одређивање броја ћелија

које су експримирале туморски антиген, као и интензитет те експресије (Brown и Smoller, 2010). Анализа је обављена применом палете моноклоналних антитела различитих произвођача и карактеристика:

Примарно антитело	Клон	Произвођач	Секундарно антитело	Терцијарно антитело	Позитивна контрола	Разблажење
CD1a	010	Immunotech	LSAB+	цитрат	тимус	без
CD68	FA-11	DAKO	LSAB+	цитрат	апендикс	1/50
p53	Bp53-11	DAKO	LSAB+	цитрат	Хочкинов лимфом	1/50
S100	104819	Novocastra	LSAB+	без	апендикс	1/1000
Vimentin	6001750	Novocastra	LSAB+	цитрат	тонзила	1/100
VEGF	554169	BP Pharmingen	LSAB+	цитрат	ангиосарком	1/2000

Табела А. Карактеристике антитела примењених у истраживању.

Сва имунохистохемијска бојења изведена су уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама UK NEQAS-a (*UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*).

Као позитивни контролни узорци за тестирање коришћени су исечци примарног карцинома дојке, хемангиома и пиогеног гранулома, који су се раније вишеструко тестирани и сигурно садрже испитиване антигене. Припремани су на исти начин као и испитивани узорци у овом истраживању. Као негативна контрола у току имунохистохемијског бојења послужили су узорци ткива третирани неимуним серумом уместо примарног антитела.

Експресија антигена посматрана је на светлосном микроскопу, посматрањем пет видних поља под великим увећањем (x400).

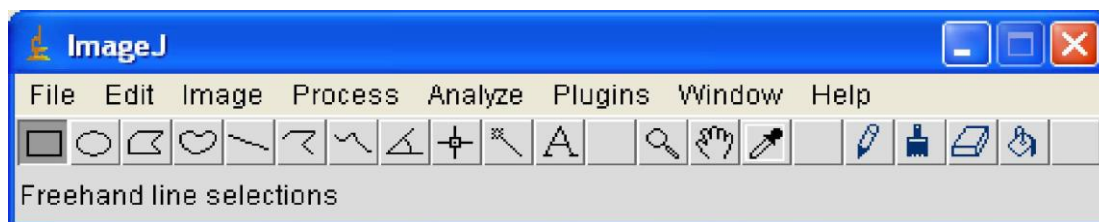
Ниво експресије p53, виментина и VEGF-а је оцењен у складу са системом бодовања који су препоручили Liang и сарадници (1999). Овај систем оцењује степен позитивности и интензитет бојења. Резултати за позитивност се крећу у распону од 0 до 3 (0 : <1 %, 1 : 1 -10 % , 2 : 10-50 % , 3 : >50 % позитивно обојених ћелија), а за ниво интензитета бојења (релативни интензитет боје позитивно обојених једара од бледо браон -1 до тамно браон -3). Комбиновањем збира ова два параметра добијају се крајње вредности од 0 до 6, што се узима као скор за експресију проучаваног параметра (Liang и сар. 1999).

Препарати су анализирани на микроскопу марке Krüss, немачке производње, а сликани су окуларном камером марке OPLENIC *Pro-MicroScan* high resolution USB 2.0 на увећањима 40X, 100X и 400X, са додатним увећањем камере од 4x.

4.2.2. Квантитативна детерминација дебљине слојева коже, колагених и еластичних влакана, основне супстанце, васкулатуре, меланина и ћелијских популација коже

Компјутерска анализа фотографија рађена је коришћењем софтверских програма *Image tool 3.0* и *Image J*, за анализу дигиталних слика написаних у програмском језику "Java" и доступних на интернет адреси: <http://rsb.info.nih.gov/ij>. *ImageJ* је слободно доступан софтвер који ради, било као *online* апликација или као *download* апликација. Програми омогућавају визуелизацију испитиваног параметра, а могу приказати, уређивати, анализирати, обрадити, меморисати и штампати 8-bitne, 16-bitne и 32-bitne слике. Програм *ImageJ* подржава стандардне функције обраде слике, али обезбеђује и одређивање разних морфометријских показатеља објекта, као што су површина, обим, дужина, фактор облика, број партикула и слично. Може мерити удаљености и углове, дакле даје тополошке односе између означених објеката. Програмом *ImageJ* могу се обављати геометријске трансформације попут ротације и скалирања. Слика се може повећати до 32:1, а смањити до 1:32. Све анализе и функције обраде су доступне на било којем фактору увећања. Програм подржава неограничен број прозора истовремено и ограничен је једино доступном меморијом рачунара (Ferreira и Rasband, 2012).

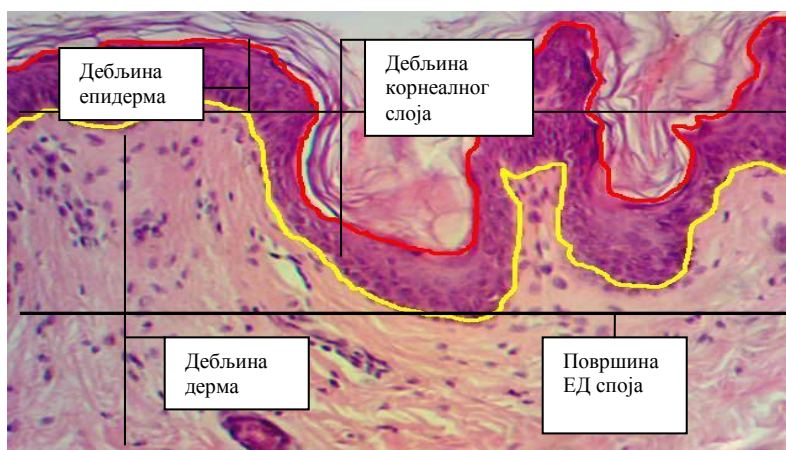
На слици бр. 2 је приказан изглед почетног менија који се отвара при стартовању програма *ImageJ*. Активирањем ставке у менију Plugins отвара се падајући мени где се бира ставка која је потребна да би се извршила одговарајућа операција, а отварањем ставке Analyse отвара се падајући мени где се бира врста квантификовања (мерања) траженог параметра.



Сл. бр. 2. Изглед главног менија *ImageJ* програма

За свако повећање микроскопа, најпре смо, уз помоћ објектног микрометра (engl. stage micrometer), који се употребљава за стандардизацију окуларног микрометра и повећање микрофотографија, калибрисали наше видно поље и утврдили додатно увећање камере од 4x. Прегледана површина једне фотографије је аналогна $1120\text{ }\mu\text{m} \times 850\text{ }\mu\text{m}$ ($0,95\text{mm}^2$), за објектив 4x и $450\text{ }\mu\text{m} \times 340\text{ }\mu\text{m}$ ($0,15\text{mm}^2$) за увећање 10x, што смо унели у Set Scale пре почетка сваке анализе. На овај начин компјутер је могао да димензије дигиталних слика које су дате у pixel-има преведе у микроне и тако нам да коректне димензије тражених параметара.

Материјал који је коришћен за одређивање дебљине слојева коже, као и површине епидермно-дермног споја чинили су узорци бојени хематоксилин-еозин методом, димензија фотографија $1120\text{ }\mu\text{m} \times 850\text{ }\mu\text{m}$. На слици бр. 3 је шематски представљен начин на који је то мерење аутоматски обављено у програму *ImageJ*. Напомињемо да је за мерење дебљине дерма, веће од $1120\text{ }\mu\text{m}$, колика је највећа ширина наших фотографија, било потребно фотографисати по 2 фотографије које су покривале простор од базалне мембране епидермиса, па све до хиподермиса, за сваки анализирани узорак. Сабирањем измерених дужина дерма на фотографијама, добили смо дебљину дерма. У случају одређивања површине епидермно-дермног споја површину смо прерачунавали на дужину о 1mm , с обзиром да је дужина анализираних фотографија $1,12\text{mm}$.



Сл. бр. 3. Шематски приказ начина одређивања дебљине вијабилног епидерма, корнеалног слоја, дерма и површине епидермно-дермног споја (модификовано према Waaijer и сар. 2012).

Материјал који је коришћен за квантификацију колагена, васкуларне мреже, простора који заузима основна супстанца екстрацелуларног матрикса, чинили су

узорци бојени методом по *Van-Gieson*-у. Претходно су од сваког парафинског блока узимана 4 ткивна пресека дебљине 5 μm на тај начин што је након сваког узетог одбацивано 10 наредних пресека, те је растојање између два суседна исечка износило 50 μm . Неопходан број мерења за интервал поверења од 95% прорачунаван је по формули:

$$n = \left(\frac{200}{y} \times \frac{SD}{x} \right)^2$$

где је: n -неопходан број видних поља; y -ниво тачности изражен као проценат одступања од средње вредности (10%); x и SD - средња вредност и стандардна девијација из пробног мерења (Kališnik, 1985).

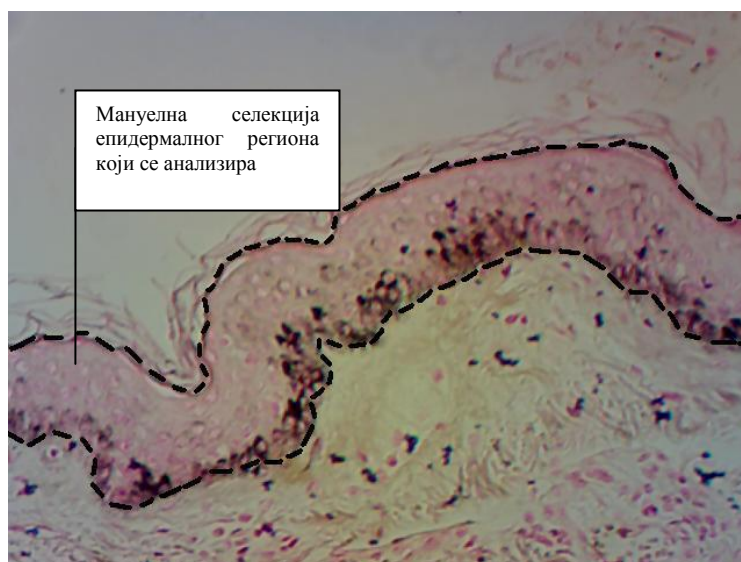
За одређивање волуменских густина колагена, васкуларне мреже и простора који заузима основна супстанца екстрацелуларног матрикса дерма, фотографисано је од сваког хистолошког пресека по 5 видних поља, укупно по узорку 20 фотографија. Користећи *Image J* са инсталираним plugin-ом за анализу броја погодака (CAST), преко начињене фотографије резолуције 640×480 пиксела постављени су крстићи (grid type), величине 30 пиксела (size), произвољног распореда (random offset) са забрањеним линијама које су имале фактор 3 (Forbidden line option factor).

Бројањем погодака на колагена влакна, крвне судове или простор основне супстанце екстрацелуларног матрикса и прерачунавањем по формули за волуменску густину, одређена је волуменска густина колагена, васкулатуре и основне супстанце ЕЦМ-а, за сваки узорак посебно, а коначне вредности су представљале средњу вредност свих узорака из групе, са приказом стандардне девијације посматраних параметара.

Волуменска густина (ВГ) је одређивана по формули $\text{Ввф} = \text{Пф} / \text{Пт}$, при чему је Ввф - волуменска густина проучаване фазе, Пф - број тачака тестног система које падају на проучавану фазу, а Пт - број тачака тестног система одређених од стране програма. Добијена вредност волуменске густине множена је бројем 100 да би се резултат изразио у процентима. Волуменска густина колагена је коригована и коначан резултат је добијен након одузимања вредности ВГ еластичних влакана, које су добијене обрадом материјала бојеним *Aldehyd fuchsin* бојењем и где је примењена идентична метода компјутерске анализе и одређивања волуменске густине као и за колаген.

Ћелијске популације коже аутоматски су квантификоване на препаратима бојеним хистохемијским методама (мастоцити) или имунохистохемијским методама (макрофаги, Лангерхансове ћелије и зреле дендритичне ћелије, меланоцити), уз помоћ *ImageJ* програма. Најпре је направљена серија фотографија која покрива цео ткивни узорак. Прегледана површина једне фотографије је аналогна $1120\ \mu\text{m} \times 850\ \mu\text{m}$ ($0,95\ \text{mm}^2$), за објектив 4x и $450\ \mu\text{m} \times 340\ \mu\text{m}$ ($0,15\ \text{mm}^2$) за објектив 10x, са додатним увећањем камере од 4x. Морфометријска анализа вршена је уз помоћ *ImageJ* програма, након колор сегментације добијених дигиталних слика у циљу побољшања квалитета издвајања објекта од интереса. У процесу аутоматског бројања издвојених објеката елиминисани су они који по величини не одговарају истраживаним ћелијама. За сваки узорак одређиван је број ћелија по површини фотографије, а затим је исти прерачунаван по mm^2 ткива дељењем добијене вредности бројем 0,95 за објектив 4x (додатно камера 4 x) или 0,15 за објектив 10x (додатно камера 4 x) и онда су добијене вредности броја ћелија по милиметру квадратном сваке фотографије сведене на просечну вредност за дати узорак.

За квантификацију меланина коришћени су хистолошки препарати обојени *Masson Fontana* хистохемијским бојењем. Користили смо методологију Miot и сар. (2012), по којој се у *ImageJ* програму користи сегментација пиксела, еквивалентних количини меланина на изабраној површини слике (сл. 4), чиме се омогућава квантификација меланина у хистолошким одељцима.



Сл. бр.4. Мануелна селекција епидермалног региона који се анализира (модификовано према Miot и сар. 2012).

4.2.3. Статистичка обрада података

Статистичка анализа спроведена је помоћу рачунара. Унос, као и табеларно и графичко приказивање података су обављени коришћењем MS Office Excel програма, а статистички прорачуни су вршени програмом MedCalc version 13.1.2.0.

Континуални (мерљиви) параметри представљени су као:

а) средња вредност (\bar{X})

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}; \bar{X} = \frac{\sum fX}{\sum f};$$

б) стандардна девијација (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum X^2}{n} - \bar{X}^2}; SD = \sqrt{\frac{\sum fX^2}{\sum f} - \bar{X}^2}$$

Тестирање статистичке значајности разлике средњих вредности између група код континуалних испитиваних параметара вршено је применом Студентовог т-теста за независне узорке. У анализи резултата коришћене су и графичке статистичке методе.

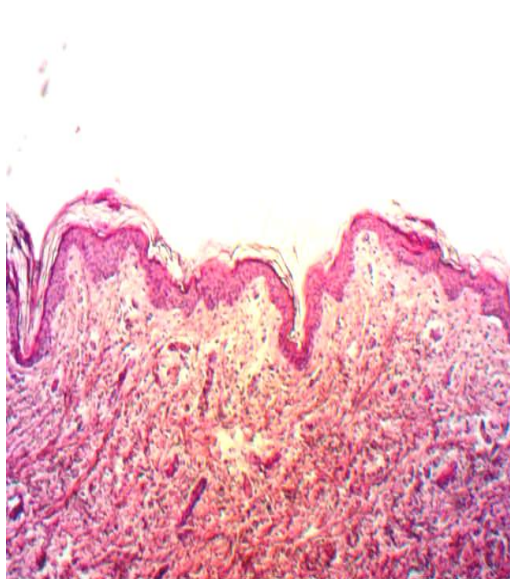
Као мера статистички значајне разлике прихваћени су стандардни нивои значајности тестова, означени са: $p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,001$.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Хистолошке карактеристике фотоекспониране и фотонеекспониране коже

5.1.1. Хистолошка анализа коже фетуса и новорођенчади

Кожа фетуса садржи два јасно одвојена подслоја-епидермис и дермис (сл. 5). Епидермис коже фетуса је представљен јасно израженим слојем базалних кератиноцита, са 1 до 2 реда ћелија у спинозном слоју и слабо израженим гранулозним слојем. Са постепеним повећањем кератиноцитне лозе формирају се и епидермни гребени, чији се зачеци виде и у овом развојном добу (сл. 5).



Сл. бр. 5. Још увек недовољно развијени конституенти коже. Постоји јасна разлика између епидермиса и дермиса. Кожа фетуса. НЕ 40х, камера 4х.

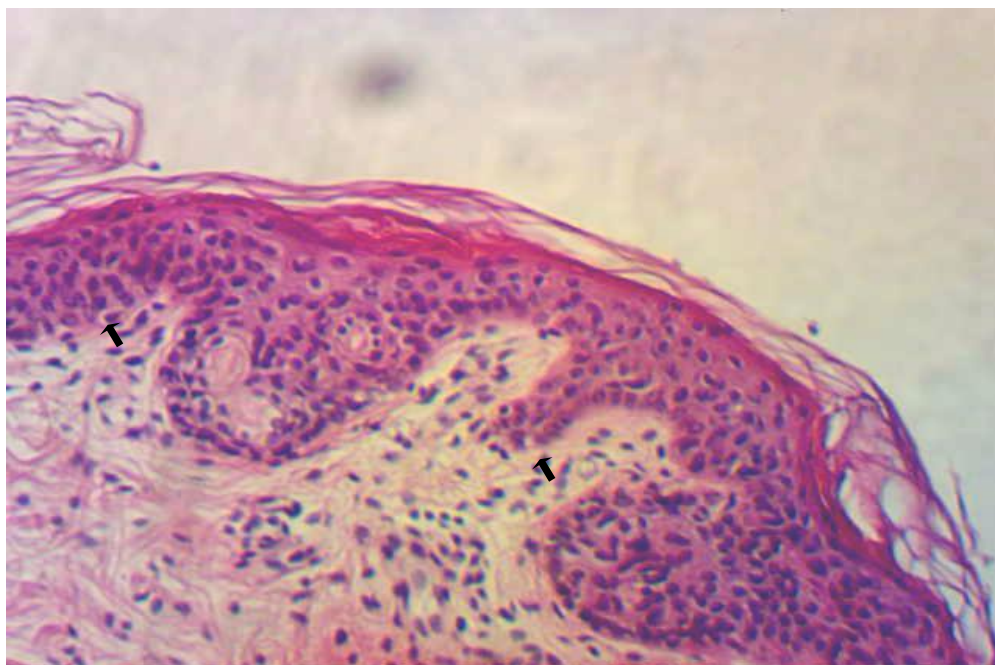


Сл. бр. 6. Добро издиференцирани подслојеви коже. Корнеални слој садржи 9 до 10 редова корнеоцита. Кожа новорођенчета. НЕ 100х, камера 4х

На хистолошким препаратима коже донешене новорођенчади виде се развијенији и јасније одвојени градивни конституенти коже: епидермис и дермис, у односу на кожу фетуса (сл. 6). Међутим, општи утисак је да кожа још увек нема хистолошку форму зреле коже. Базални слој епидермиса изграђују нискоцилиндричне ћелије базофилне цитоплазме са овалним једрима, постављене перпендикуларно у односу на базалну ламину (сл. 7). У једру се неретко запажају једно или два једарца.

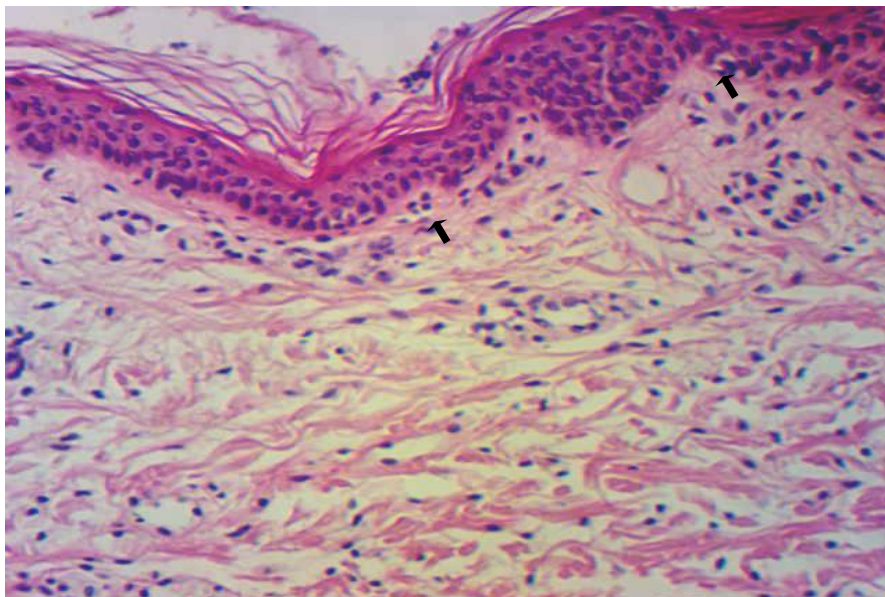
Између базалних ћелија спорадично се налазе ћелије са тамним једром и светлом цитоплазмом, које по изгледу и положају одговарају Меркеловим ћелијама или меланоцитима (сл. 7). Добро је изражен и спинозни слој, док је гранулозни слој одсутан. У базалном и спинозном слоју могу се видети бројне ћелије у процесу митозе (сл. 8). Корнеални слој епидермиса састоји се од 7 до 8 редова слабо везаних ћелија (сл. 7).

Граница између епидермиса и дермиса је неравна и таласаста. Дермис се преко папила увлачи у епидермис, а епидермис формира епидермне гребене који улазе у дермис. Међутим, има се утисак да на појединим деловима папиле нису у потпуности развијене и да је веза између епидермиса и дермиса слаба (сл. 7).

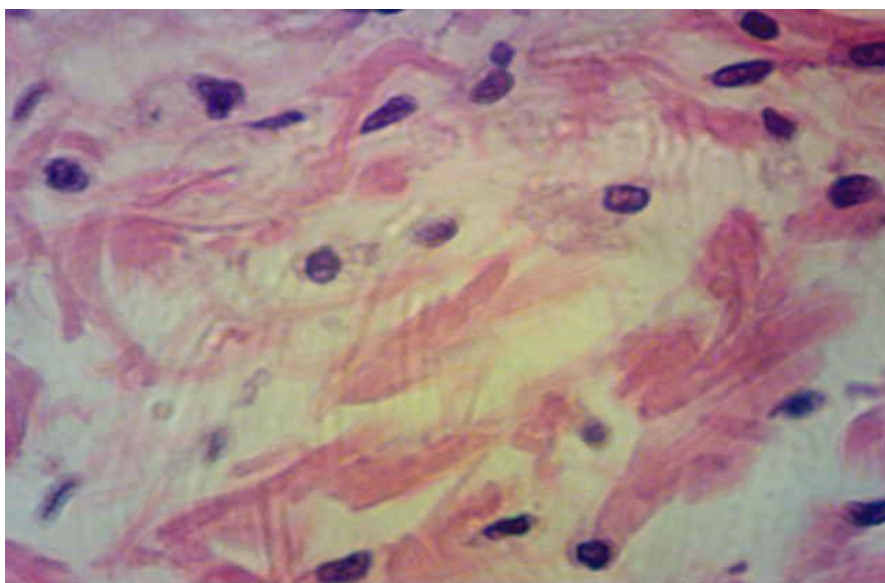


Сл. бр. 7. Базални слој епидермиса изграђују нискоцилиндричне ћелије, базофилне цитоплазме са овалним једрима, постављене перпендикуларно у односу на базалну ламину. Меркелове ћелије или меланоцити означене стрелицом. Кожа новорођенчета. НЕ 100х, камера 4х.

У папиларном дермису преовладавају слабодиферентоване везивне ћелије и танка колагена влакна, која се пружају готово паралелно површини епидермиса. Такође се виде и бројни, крупни фибробласти, смештени између танких колагених влакана (сл. 7, 8, 9) и добро развијена капиларна мрежа (сл. 8). Капиларна мрежа је посебно развијена у папиларном дермису, мада се бројни крвни судови виде и у ретикуларном дермису. Ретикуларни дермис садржи нешто дебља колагена влакна која се пружају у више различитих праваца (сл. 8).



Сл. бр. 8. У базалном и спинозном слоју епидермиса могу се видети бројне ћелије у процесу митозе (стрелице). Снопови колагених влакана, између којих се налази мноштво фибробласта у дерму. Умерено развијена капиларна мрежа. Кожа новорођенчета. HE 100х, камера 4х

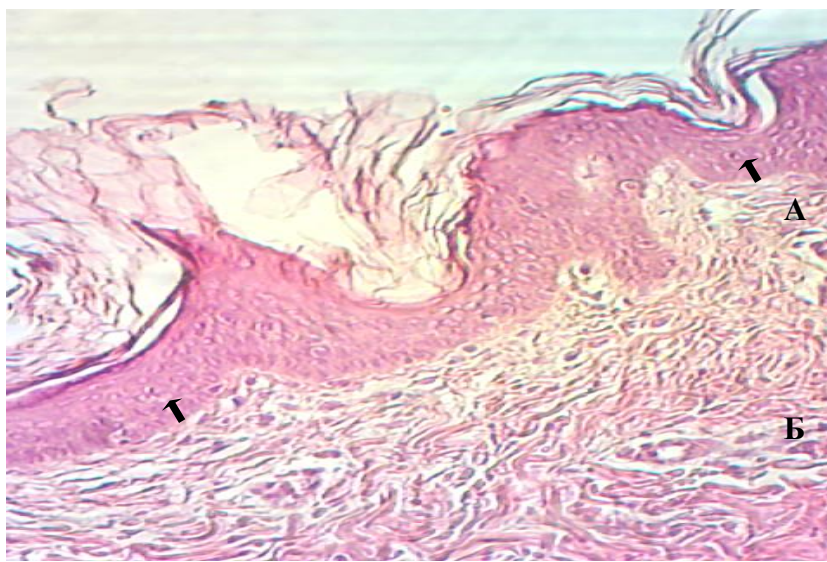


Сл. бр. 9. Бројни крупни фибробласти у дерму између колагених влакана. Кожа новорођенчета. HE 400х, камера 4х

5.1.2. Хистолошка анализа коже особа раног животног доба (од 1. до 20. године живота)

За разлику од коже фетуса и новорођене деце, хистолошка слика коже особа, групе раног животног доба има зrelu форму у којој се виде комплетно развијени структурни елементи коже: епидермис и дермис (сл. 10).

Преко базалних ћелија епидермиса у већем броју слојева наслагане су ћелије спинозног стратума. Оне су полигоналног облика и знатно крупније од базалних ћелија. Међу кератиноцитима спинозног слоја релативно су бројне ћелије изразито хетерохроматичних једара, често бизарног облика и светле цитоплазме. По хистолошким карактеристикама и локализацији ове ћелије одговарају Лангерхансовим ћелијама (сл. 10).

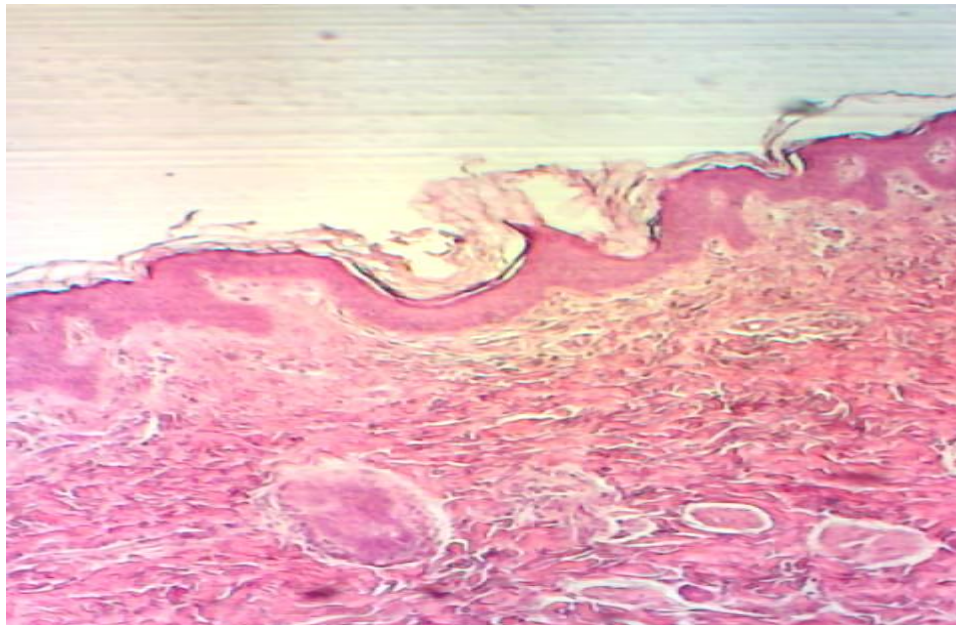


Сл. бр. 10. Папиларни (А) и ретикуларни (Б) слој дерма. Лангерхансове ћелије у спинозном слоју епидермиса (стрелице). Дете узраста 3 године, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.

У епидермису ове групе развијен је и гранулозни слој. На површини епидермиса се налази нормално развијен корнеални слој, који ни на једном од узорака, било фотоекспониране, било фотонеекспониране коже није био у форми хиперкератозе (сл. 10).

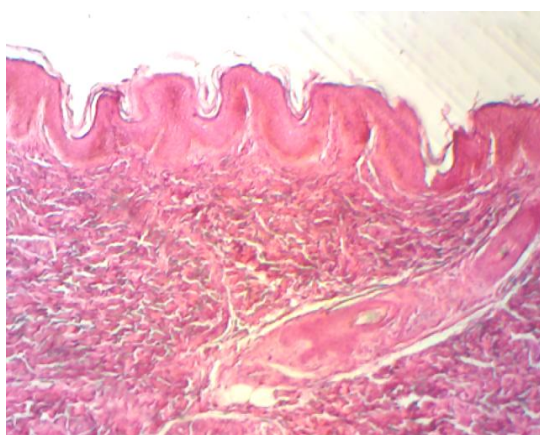
Везивно ткиво дерма се састоји из два неоштро ограничена слоја: *Stratum papillare* и *Stratum reticulare*. У оба подслоја, доминирају снопови колагених влакана. Папиларни слој је тањи, површински слој дерма, смештен непосредно испод епидерма, изграђен од растреситог везива и са сноповима колагених влакана која су растреситог изгледа. Од ћелија су заступљени фибробласти, знатно мање фиброцити, појединачни макрофаги и мастоцити. Ретикуларни слој је дебљи и дубљи слој дерма, а у њему се налази густо везивно ткиво са ирегуларно распоређеним сноповима колагених влакана, који се пружају у свим правцима. Присутна су и еластична влакна, често удружена са колагеним влакнима. У овом подслоју дерма се запажа присуство малог броја ћелија (сл. 10).

Граница између епидерма и дерма је изразито неравна и таласаста. Дерм шаље у епидерм бројне купасте изданке-папиле, док се епидерм увлачи између папила, образујући епидермне гребене, тако да се запажају бројне здепасте или шиљасте везивноткивне папиле које стреме ка површини епидерма (сл. 10, 11, 14).

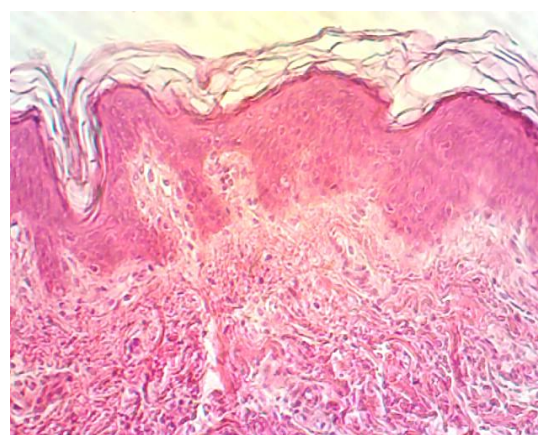


Сл. бр. 11. Запажају се бројне здепасте или шиљасте везивноткивне папиле које стреме ка површини епидерма. Девојчица 5 година, кожа врата. HE, 40x, камера 4x.

У дерму су смештени корени длака, мишићи подизачи длака, знојне и лојне жлезде, лимфни судови и специјализовани нервни завршеци (сл. 12). Између колагених снопова налази се умерено изражена мрежа капила. Капиларни зид формира једна до четири ендотелне ћелије (сл. 13).



Сл. бр. 12. Запажају се бројне шиљасте везивноткивне папиле које стреме ка површини епидерма. У дерму се види пилосебацеална јединица. Дечак, 3 године, кожа врата. HE, 40x, камера 4x.



Сл. бр. 13. Нормална хистоархитектоника епидерма и дерма. Дечак, 3 године, кожа стомака. HE, 40x, камера 4x.



Сл. бр. 14. Уређена структура епидерма и дерма. Младић, 19 година, кожа стомака. HE, 40х, камера 4х.

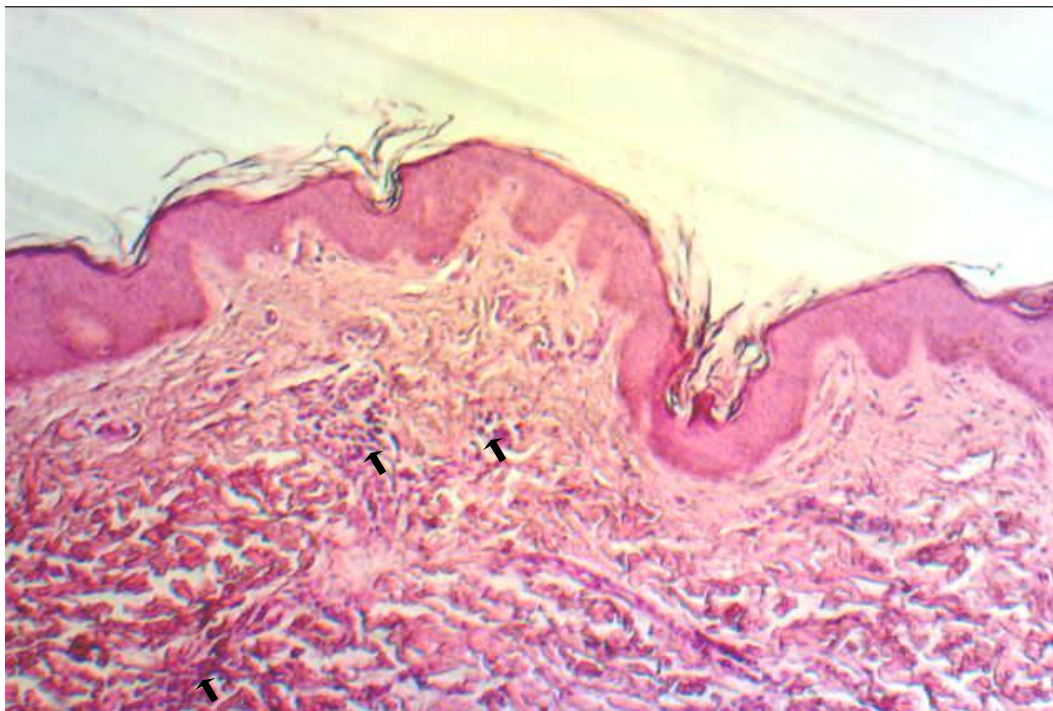
Ни на једном препарату није примећена агрегација запаљенских ћелија.

Нема разлике у хистоархитектоници фотоекспониране и фотонеекспониране коже.

5.1.3. Хистолошка анализа коже особа средњег животног доба (од 21. до 40. године живота)

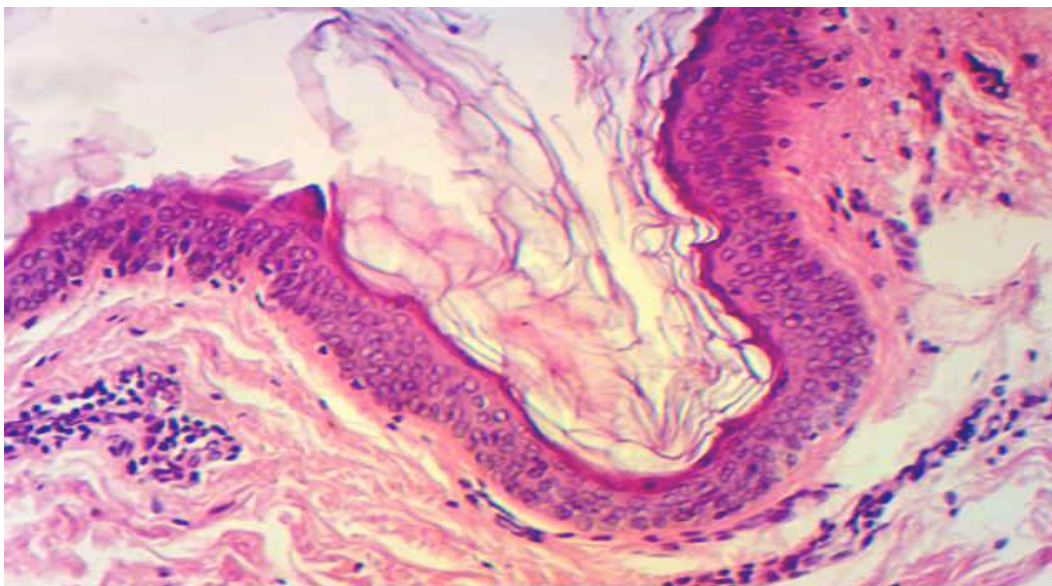
Хистолошка слика фотонеекспониране, али и фотоекспониране коже овог животног доба значајно се не разликује у односу на слику коже млађег узраста тј. групе раног животног доба. Међутим, узорци фотоекспониране коже овог узраста, у одређеној мери, међусобно се разликују, што се може довести у везу са разликом у степену инсолације и дужини трајања процеса тј. старости коже. Промене су посебно изражене у дерму, док су основна својства епидерма у највећој мери очувана (сл. 15).

Епидерм и даље има очувану структуру са кератиноцитима чије су морфолошке карактеристике, као и у кожи раног животног доба. Базални слој формира један ред нискоцилиндричних ћелија, у којима се и на *HE* бојењу, види да садрже доста меланина (тамно браон), који је фокално присутан и у вишим слојевима, супрабазалном и спинозном (сл. 15). Поред уочених промена на препаратима фотоекспониране коже, стиче се утисак да је снижена концентрацији Лангерхансових ћелија у спинозном слоју епидермиса.



Сл. бр. 15. Нормална хистоархитектоника коже. У епидерму се запажају фокалне накупине меланина. Благи периваскуларни инфилтрат у ретикуларном дерму (стрелица). Мушкарац, 37 година, кожа стомака. НЕ, 40х, камера 4х.

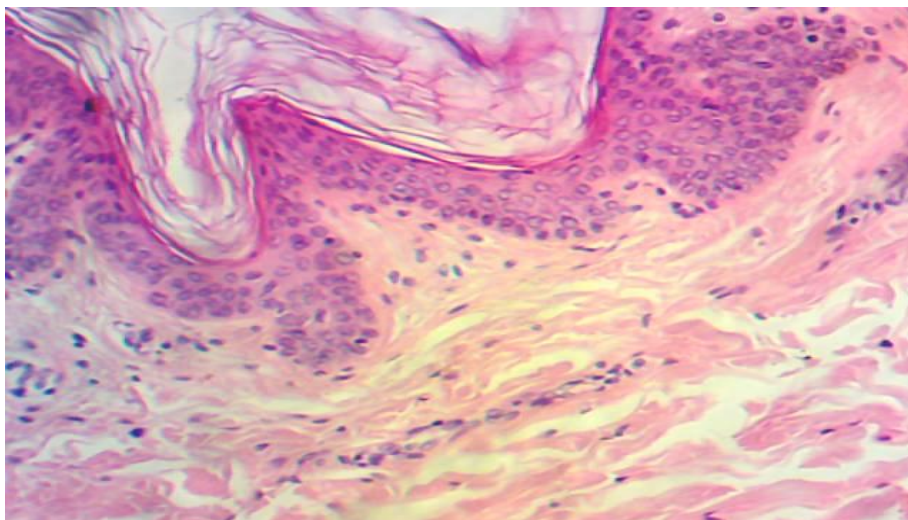
На једном броју узорака запажа се хиперкератоза (сл. 16, 17).



Сл. бр. 16. Неуснопљена, међусобно раздвојена влакна колагена. Едем. Периваскуларни инфилтрат у дерму. Мушкарац, 29 година, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.

Израженије, структурне промене се виде у везивном ткиву дерма. На једном броју узорака региструју се почетне промене и у папиларном и ретикуларном слоју дерма. Запажа се дискретно повећање простора који припада екстрацелуларном матриксу, са колагеним влакнима која су најчешће раздвојена и неуснопљена (сл. 16, 17). Међу фиксним ћелијама уочљива је доминација фибробласта над фиброцитима.

На неким узорцима фотоекспониране коже виде се дилатирани васкуларни простори. Ћелије запаљењског инфилтрата присутне су спорадично и појединачно по читавом везиву дерма, али је упадљиво њихово груписање у периваскуларним просторима, што се може сматрати реактивном, а не запаљењском реакцијом (сл. 15, 16). Епидермно-дермна граница је и даље закривљена, таласаста (сл. 17).



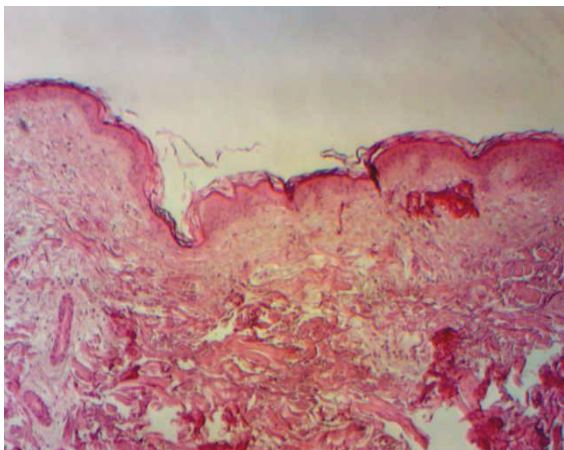
Сл. бр. 17. У дерму доминирају ирегуларно распоређени снопови колагених влакана, оријентисани у различитим правцима. Између колагених снопова запажају се фиброцити, док су инфламаторне ћелије ретке. Жена, 33 године, кожа стомака. HE, 40х, камера 4х.

5.1.4. Хистолошка анализа коже особа позног животног доба (од 41. до 60. године живота)

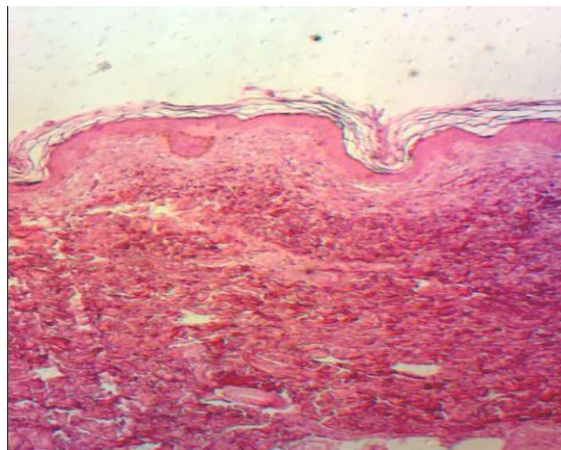
Узорци фотонеекспониране коже у овој групи показивали су незнатне промене у епидерму и значајније у дерму, у односу на претходне групе. Сем нешто дебљег корнеалног слоја и хиперкератозе, која се могла регистровати код неколико узорака, епидермис има сличне карактеристике као и у групи средњег животног доба (сл. 19).

У дерму коже која је била заштићена од Сунца, приметна је блага редукција колагених влакана. Начин организације и усмереност колагених влакана су и даље углавном правилни, уз незнатна одступања. Могу се видети кратки, танки, вијугави сегменти, али и уочити широке плоче, формиране од међусобно слепљених колагених влакана. Између колагених снопова налазе се крвни судови и периваскуларни простори. У периваскуларним просторима колагени снопови су одсутни или тањи. Упоредо са редукцијом колагена запажа се и фокално повећање простора у коме се

налази екстрацелуларни матрикс (сл. 18, 19). У дерму се види и блага редукција вакуларне мреже.

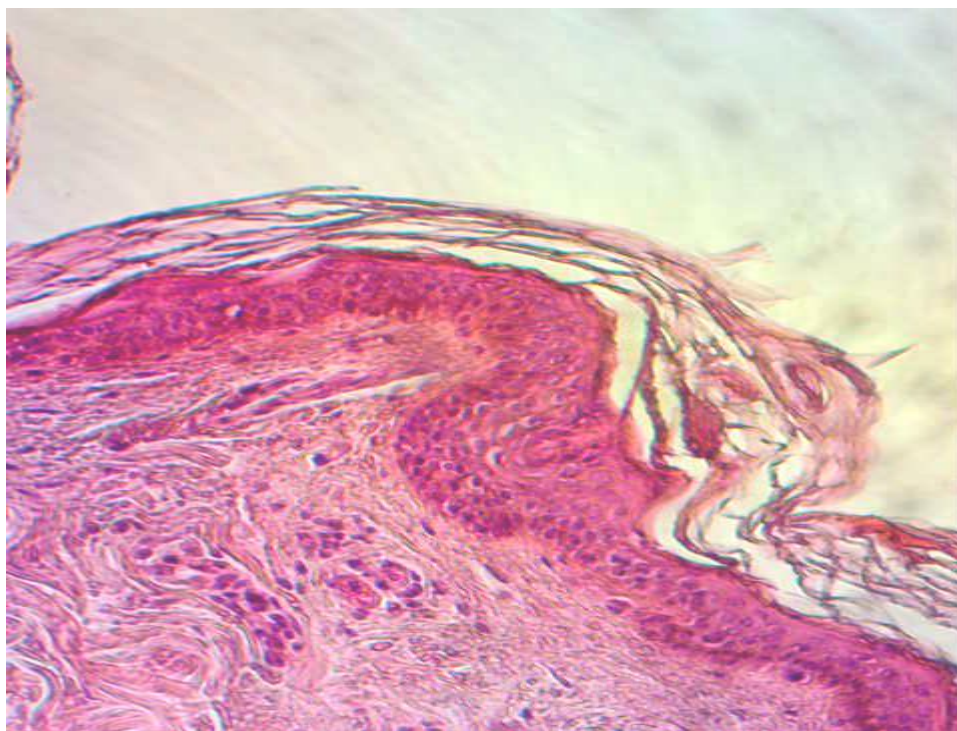


Сл. бр. 18. У периваскуларним просторима колагени снопови су одсутни или тањи. Упоредо са редукцијом колагена запажа се и фокално повећање простора у коме се налази екстрацелуларни матрикс. Колаген показује различит афинитет за боју. Жена, 49 година, кожа стомака HE, 40x, камера 4x.



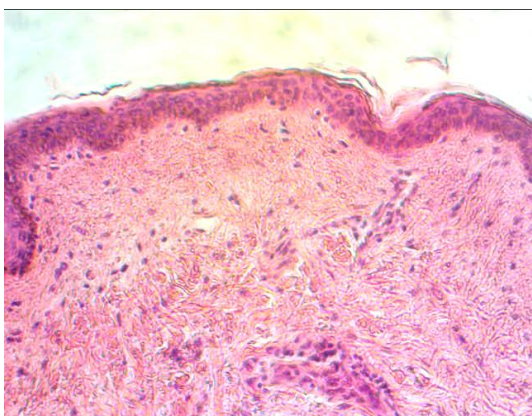
Сл. бр. 19. У дерму доминирају слеplена колагена влакна, са мало простора који припада основној супстанци. Колаген показује различит афинитет за боју. Мушкарац, 54 године, кожа стомака HE, 40x, камера 4x.

Епидерм коже особа позног животног доба, хронично изложен Сунчевом зрачењу, показује променљиву дебљину при чему акантоза преовлађује у раним стадијумима актиничног оштећења (сл. 20), док је у најтежим облицима атрофија епидерма, доминантан хистолошки знак (сл. 21).

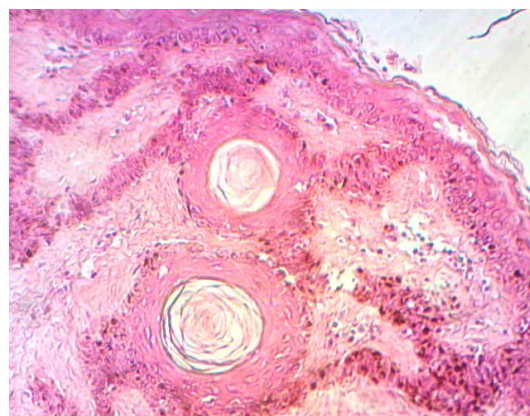


Сл. бр. 20. Акантоза, дискератотични кератиноцити, хиперкератоза. Фокална хиперплазија меланоцита. Мушкарац, 54 године, кожа врата. HE, 100X, камера 4x.

Изражена је дисплазија и дискератоза ћелија (сл. 22). Рожаста слој показује хетерогеност и у изгледу и у дебљини - може да буде задебљао, компактан или растресит. На великом броју узорака се запажа фокална хиперплазија меланоцита (сл. 20, 22), мада се има утисак да је њихов број у целини смањен. У четири случаја запажене су издужене и разгранате папиле дерма. Такође смо регистровали и фокалну кератинизацију у виду рожних циста (сл. 22).



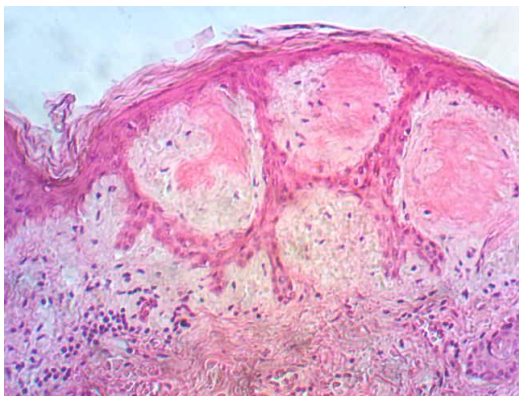
Сл. бр. 21. Епидермална атрофија. Дермно-епидермни спој је заравњен и без епидермних пречки. Дилатирани крвни судови у дерму. Жена, 58 година, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.



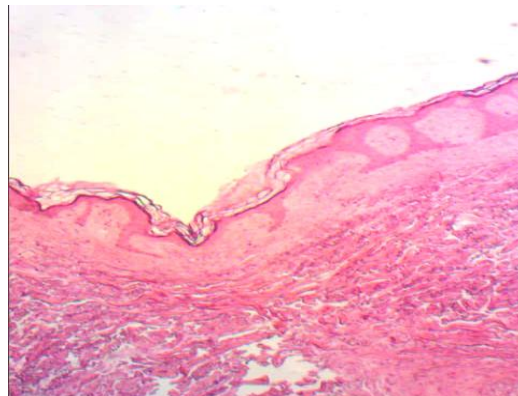
Сл. бр. 22. У испреплетаним тракама епидермних ћелија виде се две цистичне инклузије орожалог материјала, сличне орожалним цистама код хиперкератотичног типа себороичне кератозе. Бројни меланоцити, смештени између базалних ћелија садрже велику количину меланина. Мушкарац, 58 г, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.

У кожи хронично изложеној Сунчевом зрачењу, ове старосне доби, регистровали смо обележја соларне дегенерације, која су углавном ограничена на горњу трећину дерма. Она се манифестује у виду соларне еластозе и базофилне дегенерације колагена, код које су снопови колагена замењени аморфним гранулираним материјалом који се боји слабо базофилно (сл. 23). Наведени слој је издвојен од слабо атрофичног епидерма једном уском зоном нормалног колагена (сл. 24). Такође, танки колагени фибрили, који су у младој кожи смештени готово паралелно са епидермокутаном границом, овде су задебљали због попречног везивања и умрежавања. Влакна због тога губе паралелност и неправилно су распоређена. У очуваним колагеним сноповима преовлађују фиброцити, док су у оштећеним сноповима у близини инфилтрата знатно бројнији фибробласти, што се може протумачити реактивном појавом у циљу надокнаде изгубљеног колагена (сл. 23, 24). Могу се уочити и широке плоче, формиране од међусобно слепљених

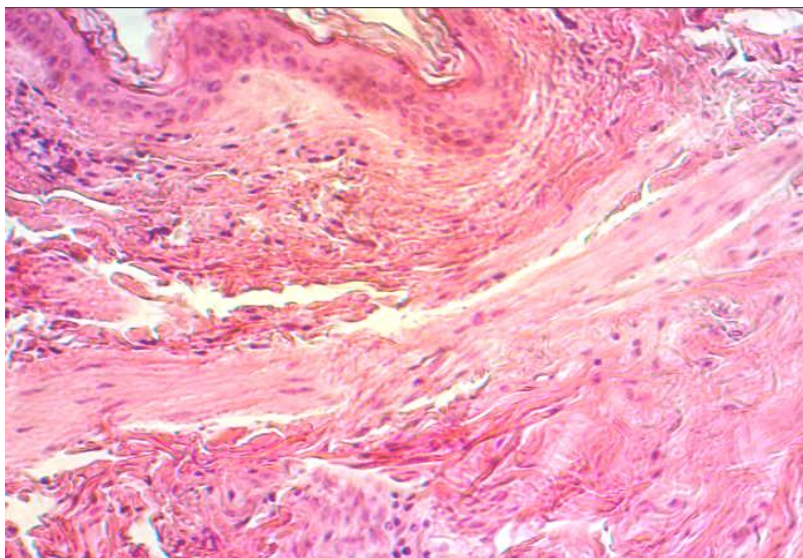
колагених влакана, између којих се налазе фиброцити. Колагена влакна показују различит афинитет за боју (сл. 25).



Сл. бр. 23. Атипични базални кератиноцити. Базофилна дегенерација колагена. Едем горњег дермиса и мрљаста, претежно лимфоцитни инфилтрат испод едематозне зоне. Постоји неправилна пролиферација у дубину епидермних пречки, које се местимично спајају при дну. Хијалинизација. Жена, 57г, кожа врата. HE, 100X. камера 4х.

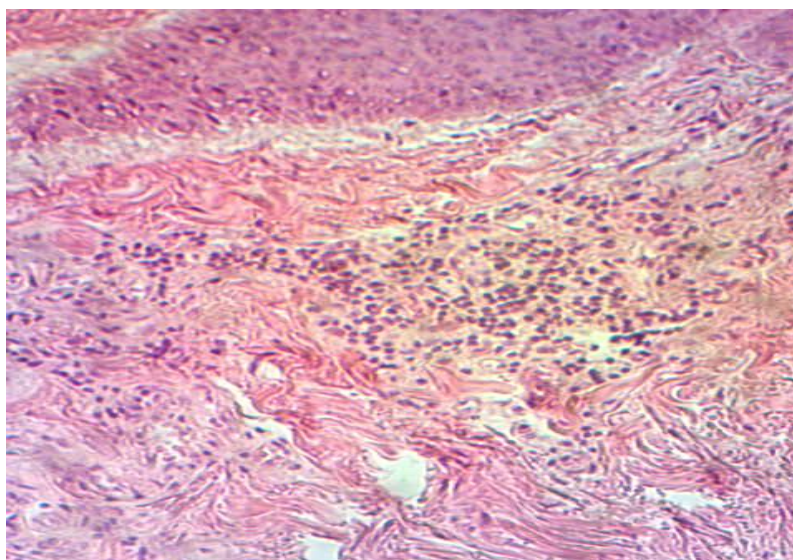


Сл. бр. 24. Епителне пречке су издужене и задебљале на свом доњем делу где се местимично спајају. Формирају мрежасту структуру. Соларна еластоза. Повећан простор који припада ЕЦМ у ретикуларном дерму. Мушкарац, 57г, кожа врата. HE, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 25. Атипични базални кератиноцити. Фокална хиперплазија меланоцита. Сплета колагена влакна између којих се налазе фиброцити. Колаген показује различит афинитет за боју. Мушкарац,

На неким узорцима се виде и знаци хроничног запаљења, као и повећан простор који заузима ЕЦМ. Упадљив је запаљенски инфилтрат сачињен од лимфоцита и макрофага (сл. 26). Крвни судови дерма су често дилатирани (сл. 20, 21).



Сл. бр. 26. Дермис садржи делимично ограничени лимфоплазмоцитни инфилтрат. Колагена влакна слеplена, различите пријемчивости за боје. Мушкарац, 55г, кожа врата. HE, 100X, камера 4х.

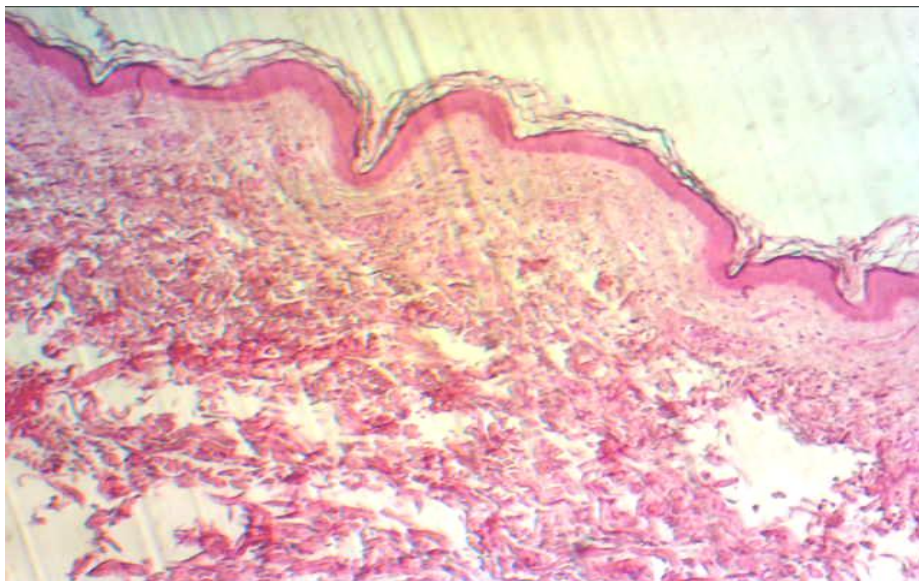
На неким узорцима се запажа промењена граница између епидермиса и дермиса. Епидермис неправилно пролиферише у дубину дермиса. Епидермне пречке су издужене и задебљале на својим крајевима, а могу формирати и мрежасту структуру (сл. 23, 24).

5.1.5. Хистолошка анализа коже особа старијих од 60 година

На истраживаном материјалу, интринзички остареле коже, овог животног доба, запажа се општи губитак ћелијских елемената и екстрацелуларног матрикса дерма.

Епидермис је атрофичан и нема епидермних пречки. Дермно-епидермна граница је заравњена и стиче се утисак да атрофија епидерма настаје као последица повлачења епидермних пречки из дерма (сл. 27).

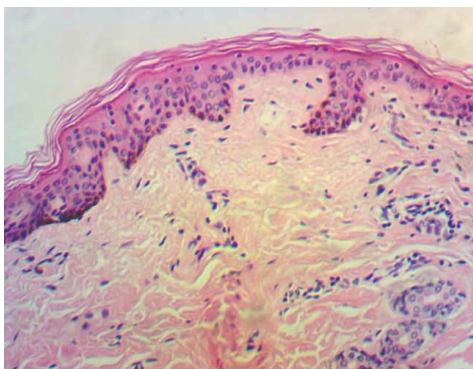
Колагени снопови у дерму су фрагментисани, делимично или потпуно лизирани. У основи је видљива јака редукција влакана, као и делимични поремећај у начину организације. Могу се видети кратки, танки сегменти, а често се запажају остаци колагена у виду зрнастог материјала. Између колагених снопова налазе се крвни судови и периваскуларни простори (сл. 27).



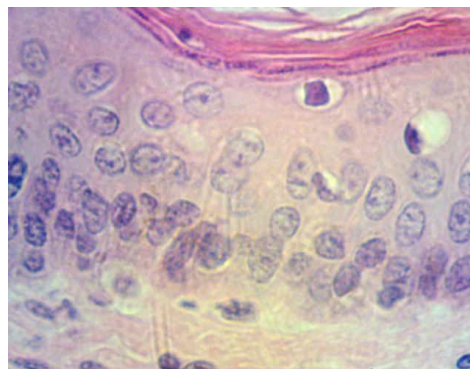
Сл. бр. 27. У дермису видљива јака редукција влакана, као и поремећај у начину организације. Жена 77 г, кожа стомака. HE, 40x, камера 4x.

Видљива је и изражена редукције кутане микроваскулатуре, кроз смањење густине и величине крвних судова, у поређењу са младом кожом (сл. 27).

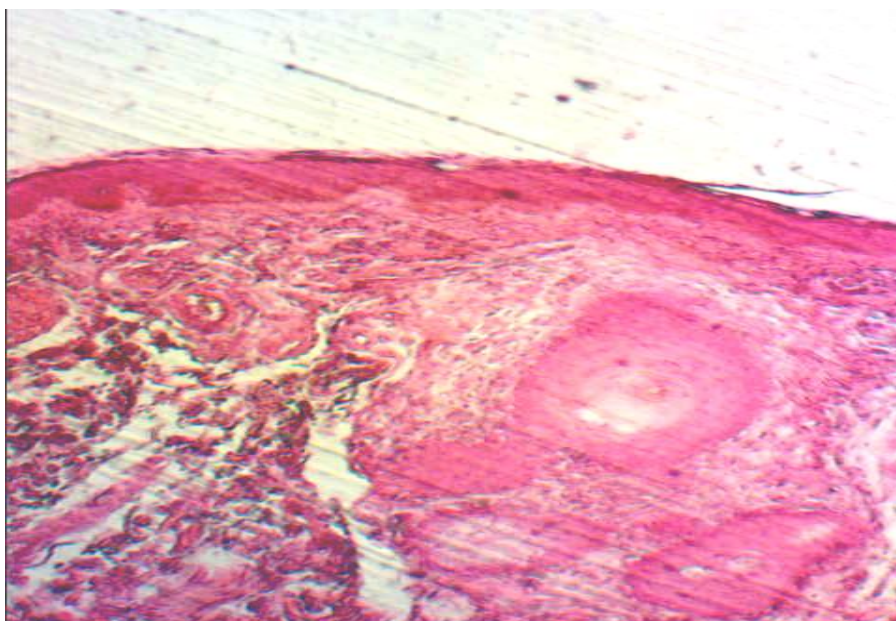
Хистоархитектоника фотоекспониране коже, ове животне доби, нарушена је у значајној мери. Хистопатолошке промене се уочавају како у епидерму, тако и у дерму. Хистолошком сликом доминирају атрофија епидерма, али и „архитектонски хаос“ епидерма, са промењеним кератиноцитима. У стандардним пресецима фотоекспониране коже, бојеним хематоксилин-еозином, у великом броју случајева се запажају промене (акантоза, дискератотични кератиноцити, хиперкератоза) које по својим особинама сугеришу на соларну кератозу, биомаркер фотооштећене коже (сл. 28, 29, 31). Наиме у епидерму се запажа повећање базалних кератиноцита и њихових једара, као и неправилан распоред ових ћелија дуж дермно-епидермне границе. Акантоза је један од учесталијих знакова на овако промењеној кожи (сл. 29, 31, 32). На неким узорцима се види и хиперкератоза (сл. 31).



Сл. бр. 28. Соларни лентиго, акантоза, појачана пигментација базалног ћелијског слоја, повећање броја меланоцита Жена, 67г, кожа врата. HE, 100X, камера 4x.

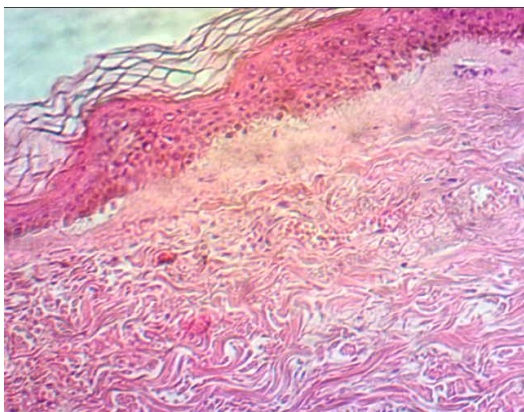


Сл. бр. 29. Дискератотичне ћелије у промењеном епидермису. Мужарац, 79г, кожа врата. HE, 400X, камера 4x.

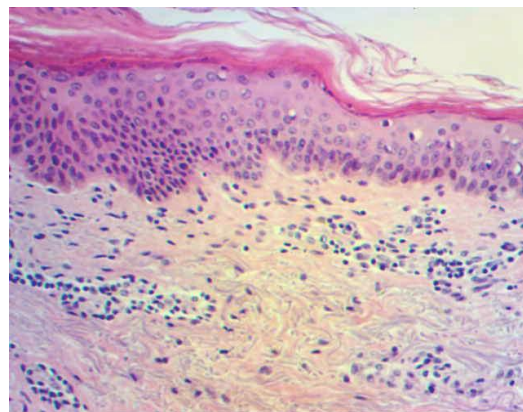


Сл. бр. 30. Полициклични прстенови у дерму. Изражена лиза колагена и повећан простор који припада основној супстанци екстрацелуларног матрикса. Мушкарац 73г, кожа врата. HE, 40х, камера 4х.

Дерм показује обимну соларну еластозу. Еластозни материјал у дерму подсећа на „исецкане шпагете“ или је у виду хомогене, готово хрскавичаве масе (траке) у горњем делу ретикуларног дерма (сл. 30, 31). И на нашим препаратима се види да соларна дегенерација не захвата уску зону непосредно испод епидерма и око аднекса, која се зове Гренцова зона. У појединим областима између колагених снопова запажа се редукција броја фибробласта до те мере да се у појединим зонама ове ћелије уопште не уочавају (сл. 30, 31). У ретикуларном дерму се често виде карактеристични хијалинизовани полициклични прстенови промењеног колагена (сл. 30).



Сл. бр. 31. Епидермис је акантогичан и нема епидермалних пречки. Соларна еластоza у дерму. Мушкарац 81г, кожа врата. HE, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 32. Акантоза, дискератотичне ћелије у епидермису. Хиперкератоза. Ограничени периваскуларни инфилтрати у дерму. Жена 70г, кожа врата. HE, 40х, камера 4х.

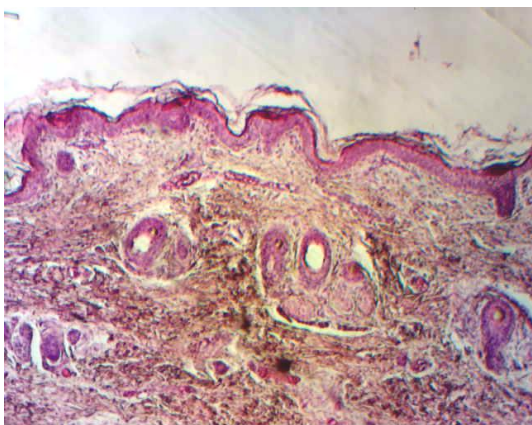
У дерму се на великом броју узорака могу видети запаљењским инфилтрати, претежно од лимфоцита. У појединим случајевима инфилтрати су густе и траколике (сл. 28, 32).

5.1.6. Опишта организација и дебљина вијабилног епидермиса

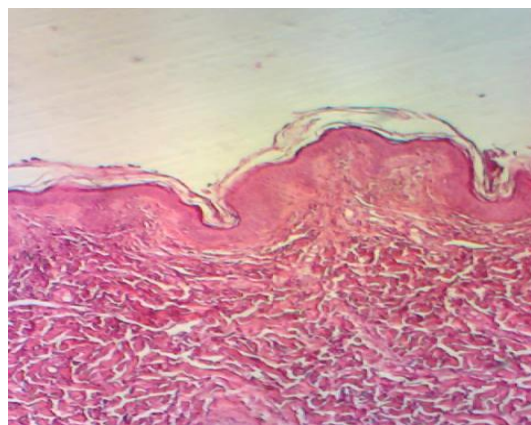
Хистолошком анализом узорака коже фетуса и новорођене деце запажа се делимично развијен, танак епидермис, са неизраженим папилама, који се не разликује у односу на регију (кожа врата или кожа стомака) (сл. 33). Кожа групе, раног животног доба, и на врату и на стомаку, има развијенији тј. дебљи епидермис у односу на кожу беба, чија се дебљина такође не разликује унутар саме групе, у односу на то да ли је фотоекспонирана или фотонеекспонирана кожа. Епидермис има нормалну архитектонику, са нормалном грађом кератиноцита (сл. 34).

Хистолошком, квалитативном анализом смо запазили да најдебљи епидермис, нормалне грађе, има група средњег животног доба, нешто дебљи на кожи врата, у односу на кожу стомака (сл. 35, 36). Такође смо запазили да са старењем (група позног животног доба) (сл. 37, 38) и (група најстаријих), епидерм постаје тањи, са свега 2 до 3 реда кератиноцита (сл. 39, 40). Ово смањење епидермалне дебљине настаје због повлачења епидермних пречки, које у групи најстаријих потпуно нестају (сл. 39, 40), али и због смањења броја ћелија у сваком од слојева, што је посебно наглашено у спинозном слоју (сл. 41). Стиче се утисак да се у групи позног животног доба, као и групи најстаријих (преко 60 година старости), регресивни процеси одражавају и на квалитативне и на квантитативне карактеристике епидермиса.

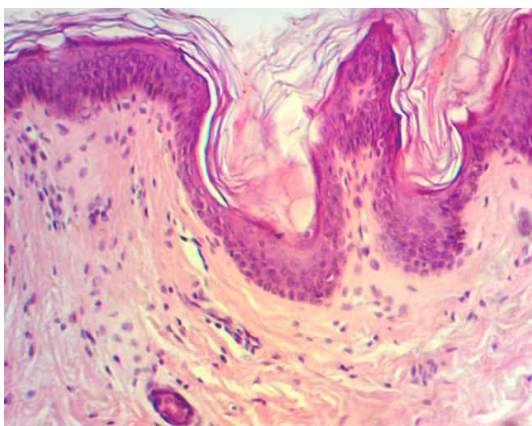
Унутар самих група (позно и најстарије животно доба) уочава се да је епидермис нешто тањи на кожи врата, у односу на кожу стомака, иако има неколико узорака коже врата, унутар ових група, који показују задебљање епидермиса и изражену акантозу. Запазили смо да се на неким узорцима налази варијабилна дебљина са наизменичним подручјима изражене атрофије и хиперплазије и високим степеном нуклеарне атипичности у кератиноцитима. На овим препаратима се уочава тзв. промена у архитектоници епидермиса у форми “архитектонског хаоса”, са измењеним кератиноцитима (сл. 41, 42).



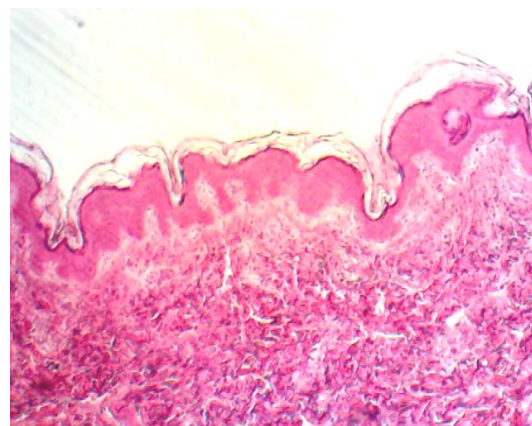
Сл. бр. 33. Делимично развијен али танак епидермис, без изражених папила. Кожа фетуса. НЕ, 40х, камера 4х.



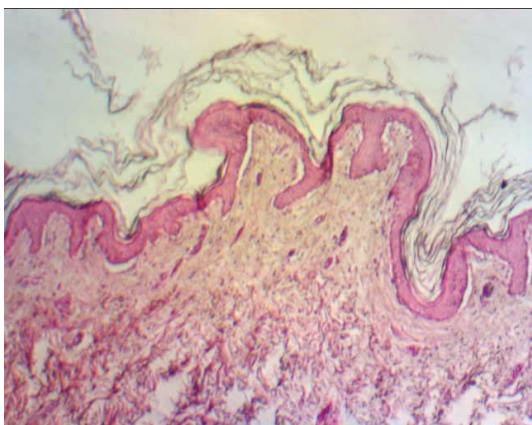
Сл. бр. 34. Добро развијен епидермис и јасно одвојен од дермиса. Дечак, 12 г, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.



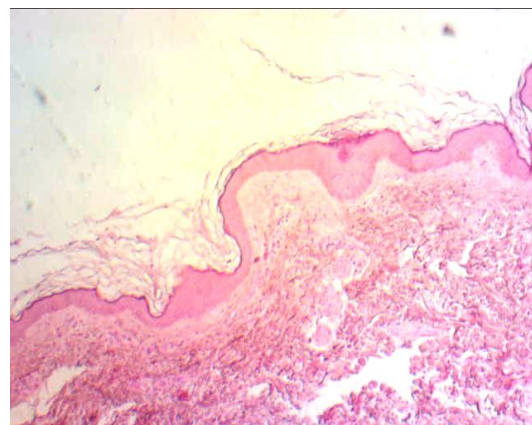
Сл. бр. 35. Епидермис са зонама умерене хипертрофије и делимичне атрофије. Мушкарац, 39г, кожа врата. НЕ, 100Х



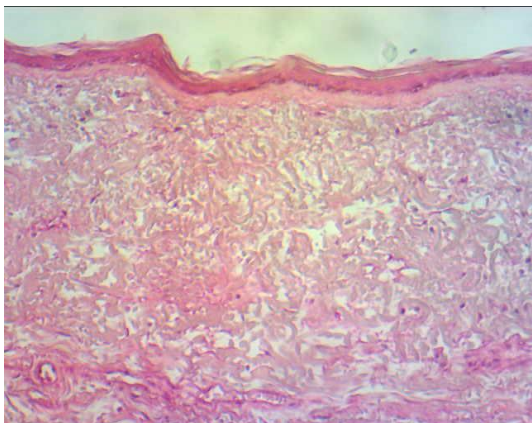
Сл. бр. 36. Епидермис уобичајене, нормалне грађе. Мушкарац, 29 година, кожа стомака НЕ, 40х, камера 4х.



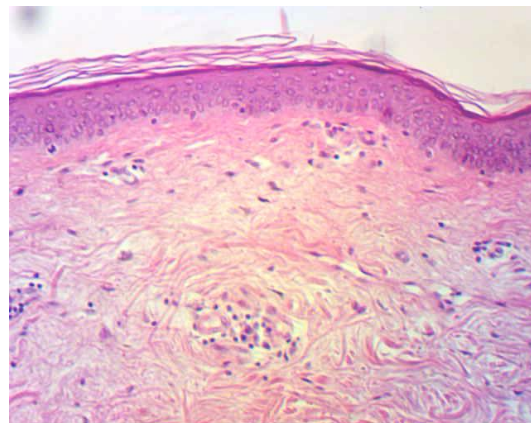
Сл. бр. 37. Општа атрофија епидермиса, али и даље нормалне грађе. Мушкарац, 58г, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.



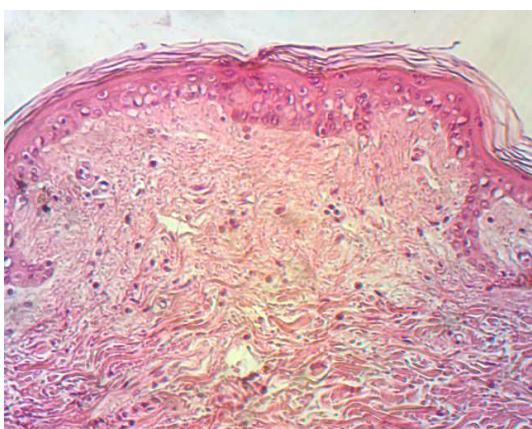
Сл. бр. 38. Блага атрофија епидерма, нормалне грађе. Мушкарац, 58г, кожа стомака. НЕ, 40х, камера 4х.



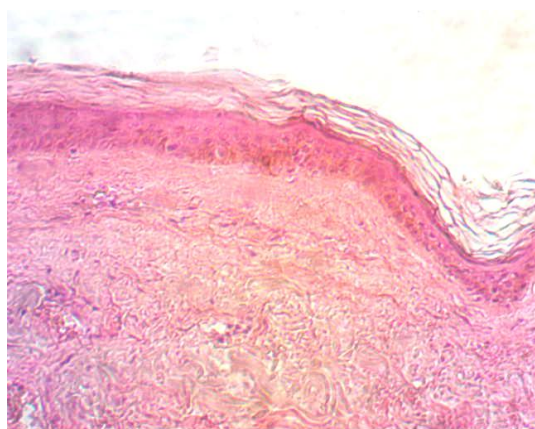
Сл. бр. 39. Апсолутна атрофија епидерма. Мушкарац, 82г, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 40. Епител са више редова кератиноцита. Жена 67г, кожа стомака. НЕ, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 41. Промена у грађи епитела у форми „архитектонског хаоса“. Мушкарац, 81 година, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 42. Епител са два до три реда промењених кератиноцита. Жена, 80 година, кожа врата. НЕ, 40х, камера 4х.

Мерење дебљине епитела коже врата, употребом *Image J* програма, показује да је дебљина епитела најмања у кожи беба ($26.54 \pm 6.12 \mu\text{m}$), а највећа у групи средњег животног доба ($68.87 \pm 11.53 \mu\text{m}$). У групи раног животног доба, епидерм коже врата има просечну вредност $59.41 \pm 15.66 \mu\text{m}$, у групи позног животног доба просечно $44.72 \pm 12.71 \mu\text{m}$, а у групи најстаријих $36.47 \pm 6.72 \mu\text{m}$.

Епидерм коже стомака је најтањи код беба ($27.03 \pm 4.73 \mu\text{m}$), расте на ниво од $56.07 \pm 11.44 \mu\text{m}$ у кожи раног животног доба и $66.31 \pm 12.02 \mu\text{m}$, у кожи особа средњег животног доба. Након раста, код особа старости од 41 до 60 година има тренд опадања и просечно износи $57.22 \pm 14.62 \mu\text{m}$. Тренд опадања се наставља и у групи најстаријих, где је вредност $42.18 \pm 9.11 \mu\text{m}$ (Табела бр. 1; Графикон бр. 1).

Статистичка анализа показује да не постоји значајна разлика у дебљини епидерма коже врата и стомака новорођене деце. У односу на кожу беба, кожа групе раног животног доба има значајно дебљи епидерм, и на врату, и на стомаку ($P < 0,001$; $P < 0,001$) а у оквиру саме групе нема значајне разлике између дебљине епидерма коже

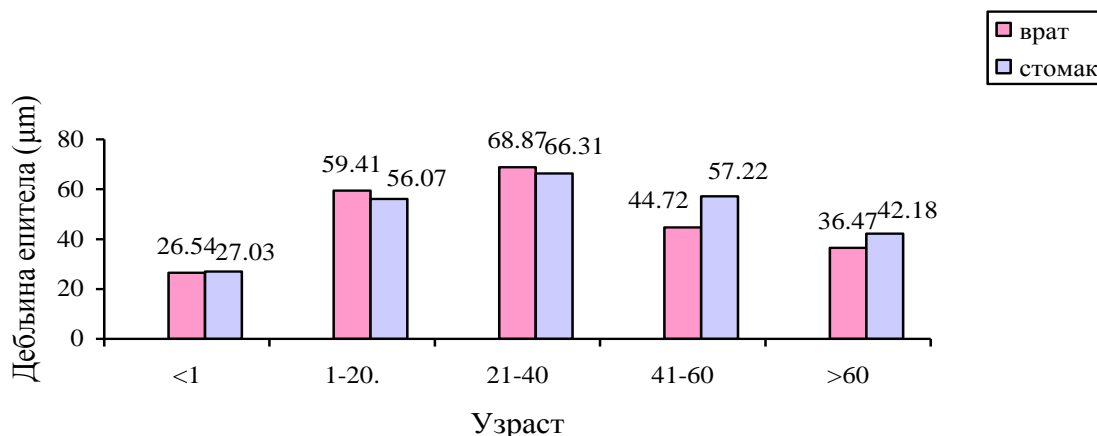
врата и коже стомака. Епидерм коже групе средњег животног доба (21-40 г) је значајно дебљи у односу на кожу врата ($P<0,05$) и кожу стомака ($P<0,01$) групе раног животног доба. Статистичка анализа показује да у групи средњег животног доба, не постоји статистички значајна разлика у дебљини епидерма између коже врата и стомака. Група позног животног доба има значајно тањи епидерм на кожи врата ($P<0,001$) и кожи стомака ($P<0,05$) у односу на групу средњег животног доба. У оквиру треће групе (позно животно доба) региструје се статистички значајно дебљи епидерм на кожи стомака ($P<0,01$). Епидерм коже најстаријих је значајно тањи у односу на групу позног животног доба, и на врату ($P<0,05$) и на стомаку ($P<0,001$), а разлика постоји и између регије врата и стомака у оквиру саме групе најстаријих, где је регистрован сигнификантно дебљи епидерм на кожи стомака ($P<0,05$).

Табела бр. 1. Дебљина вијабилног епитела у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (μm)		врат vs стомак	Кожа стомака (μm)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	26.54	6.12		27.03	4.73
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	59.41 a***	15.66		56.07 a***	11.44
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	68.87 б*	11.53		66.31 б**	12.02
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	44.72 c***	12.71	**	57.22 c*	14.62
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	36.47 d*	6.72	*	42.18 d***	9.11

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

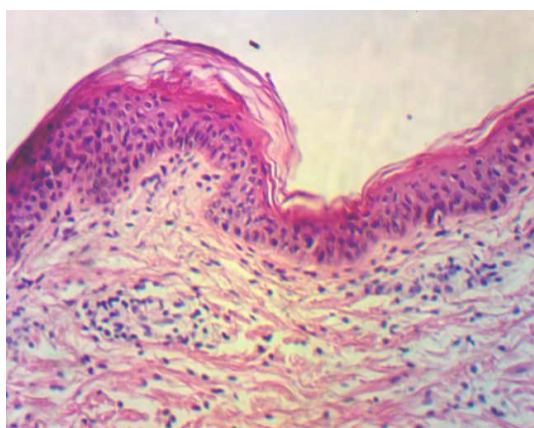
a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



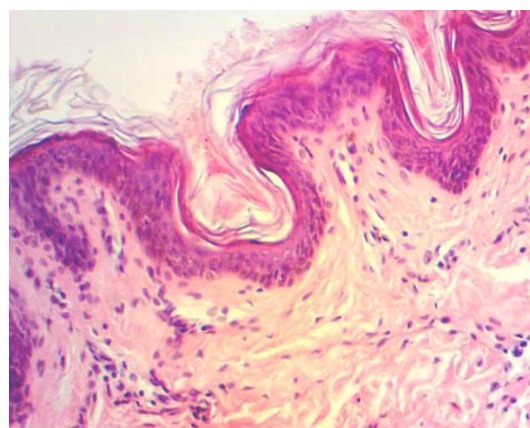
Графикон бр. 1. Дебљина вијабилног епитела у испитиваним групама

5.1.7. Општа организација и дебљина *Stratum corneum*-а

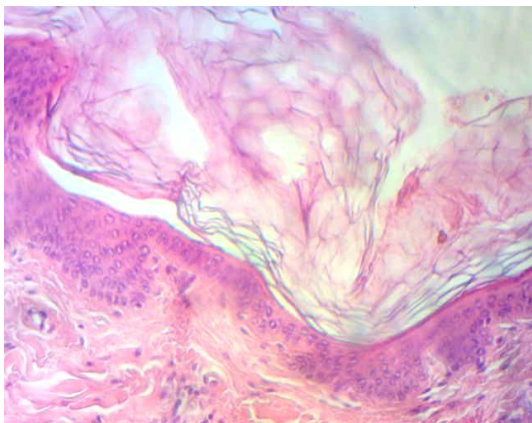
Кожа фетуса и новорођене деце има корнеални слој израђен од 7 до 8 редова рожастих ћелија, које се називају корнеоцити. Ове ћелије су без једара, љуспастог су облика и састоје се од чврстог ћелијског омотача. У унутрашњости ћелије се налазе густо збијени кератински филаменти, потопљени у матрикс (сл. 43). Младе особе, групе раног животног доба, имају нешто дебљи корнеални слој на кожи врата и стомака, у односу на кожу фетуса и новорођене деце, са већим бројем редова корнеоцита, растресите форме (сл. 44). Кожа врата средњег животног доба, на једном броју узорака, показује хиперкератозу растреситог типа, са великим бројем редова корнеоцита (најчешће, 15-17), која је израженија у односу на кожу стомака у самој групи, а и у односу на групу раног животног доба (сл. 45, 46). На овим узорцима се запажа да су у доњем делу рожастог слоја, ћелије међусобом спојене, док су у горњем делу кохезивне структуре изгубљене, а корнеоцити десквамирани (сл. 45). Највећи број редова корнеоцита види се на кожи врата групе позног животног доба (најчешће, 16-20), растресите форме (сл. 47), док кожа стомака садржи углавном мањи број редова корнеоцита, у компактном уређењу, али смо регистровали и случајеве са израженом хиперкератозом (сл. 48). Група најстаријих, на кожи врата има углавном компактну форму корнеалног слоја, и на узорцима код којих се евидентира хиперкератоза (сл. 49) и на узорцима који имају нормалан корнеални слој са мањим бројем редова корнеоцита. Слична форма региструје се и на кожи стомака, групе најстаријих (сл. 50).



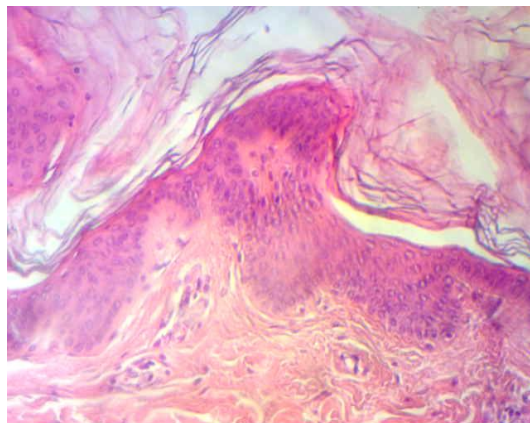
Сл. бр. 43. Корнеални слој садржи 7-8 редова корнеоцита. Новорођенче. HE, 100X, камера 4х.



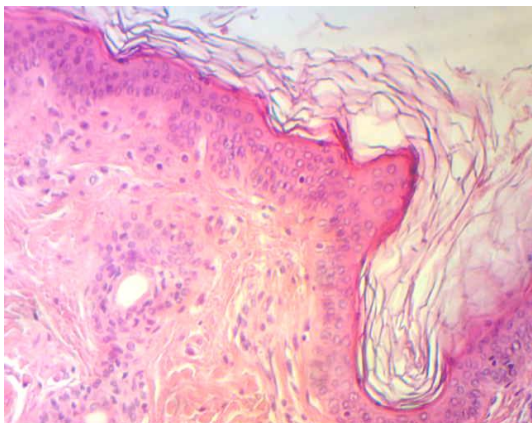
Сл. бр. 44. Корнеални слој садржи 9-10 редова корнеоцита у растреситој форми. Дечак, 13 година, кожа врата. HE, 100X, камера 4х.



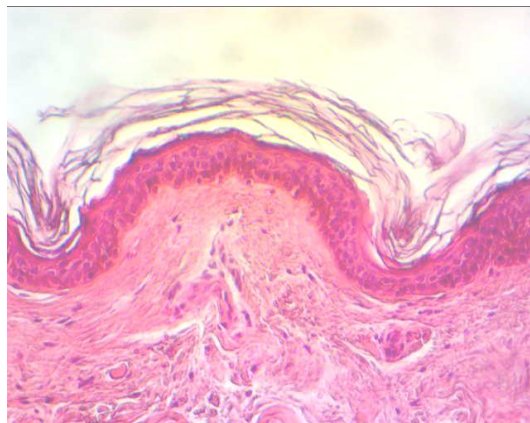
Сл. бр. 45. Хиперкератоза. Растресита форма рожастог слоја. Мушкарац, 38г, кожа врата. HE, 100X, камера 4х.



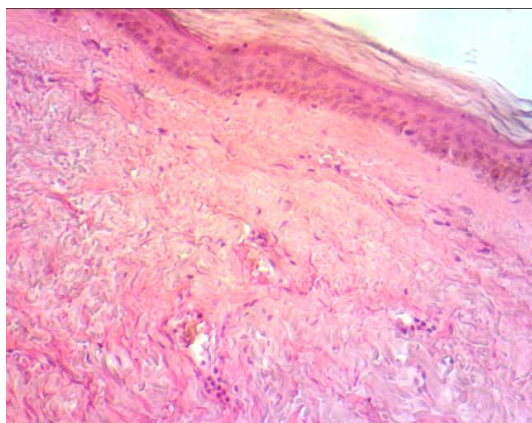
Сл. бр. 46. Хиперкератоза. Растресита форма рожастог слоја. Мушкарац, 38г, кожа врата. HE, 100X, камера 4х.



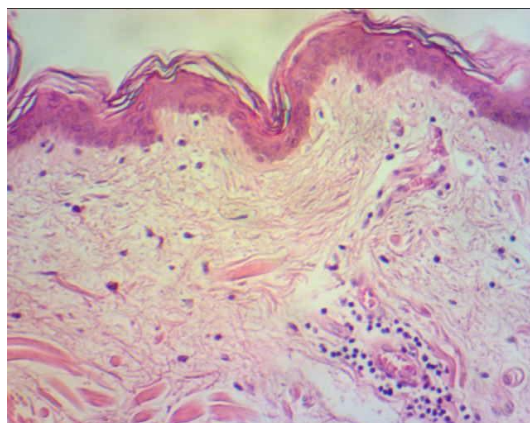
Сл. бр. 47. Хиперкератоза. Мушкарац, 55г, кожа врата HE, 100X, камера 4х.



Сл. бр. 48. Хиперкератоза. Мушкарац, 55г, кожа стомака. HE, 100X, камера 4х.



Сл. бр. 49. Хиперкератоза. Компактан рожасти слој. Атрофија епидерма. Соларна еластоза. Мушкарац 79г, кожа врата. HE, 100X, камера 4х.



Сл. бр. 50. Корнеални слој изграђен од 4 до 5 слојева корнеоцита. Жена, 72г, кожа стомака. HE, 100X, камера 4х.

Мерењем, употребом *ImageJ* програма, и статистичком обрадом података установљено је да је просечна дебљина корнеалног слоја коже беба на врату

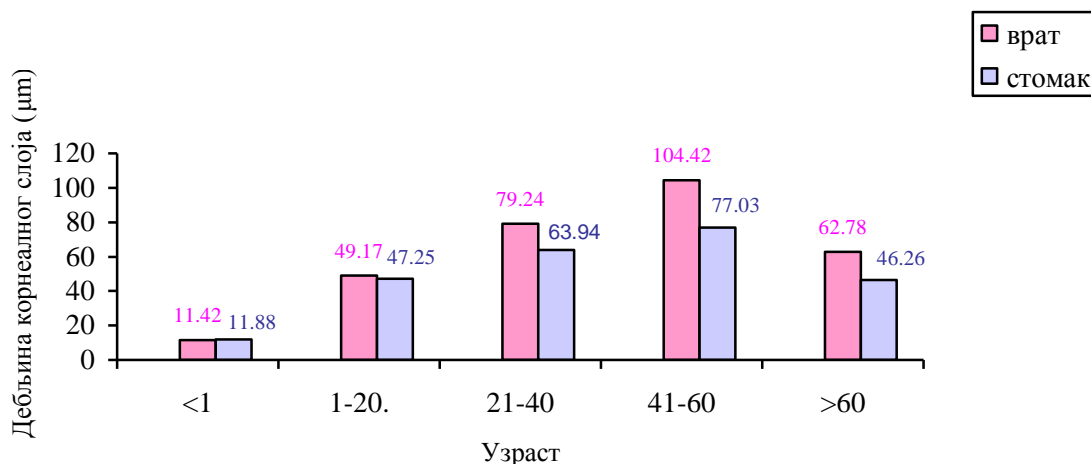
11.42±5.11 μm , а на стомаку 11.88±6.31 μm (Табела бр. 2; Графикон бр. 2) и да та разлика у дебљини није статистички значајна. У групи раног животног доба, дебљина корнеалног слоја расте и на кожи врата и стомака, у односу на кожу беба ($P<0,001$; $P<0,001$), али нема статистички значајне разлике унутар саме групе између ових регија коже. Корнеални слој коже врата, групе средњег животног доба је значајно дебљи у односу на кожу врата ($P<0,001$) и кожу стомака ($P<0,001$) групе раног животног доба. Статистички значајна разлика дебљине корнеалног слоја, између коже врата и стомака, регистрована је и у оквиру саме друге групе, где је евидентирана већа дебљина на кожи врата ($P<0,05$). Корнеални слој коже врата групе позног животног доба је значајно дебљи у односу на групу средњег животног доба ($P<0,001$), док је на кожи стомака значајно дебљи, али за нижи ниво поверења ($P<0,05$). Статистички значајна разлика дебљине корнеалног слоја, између коже врата и стомака, регистрована је и у трећој групи, са дебљим корнеалним слојем на кожи врата ($P<0,01$). Група најстаријих има значајно тањи корнеални слој и коже врата и коже стомака ($P<0,001$; $P<0,001$) у односу на трећу групу. Разлика у дебљини корнеалног слоја између коже врата и коже стомака евидентира се и у групи најстаријих, где је корнеални слој је дебљи на кожи врата ($P<0,01$).

Табела бр. 2. Просечна дебљина корнеалног слоја у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (μm)		врат vs стомак	Кожа стомака (μm)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	11.42	5.11		11.88	6.31
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	49.17 a***	14.01		47.25 a***	13.60
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	79.24 б***	24.87	*	63.94 б***	17.02
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	104.42 с***	36.28	**	77.03 с*	17.92
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	62.78 d***	17.12	**	46.26 d***	14.42

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

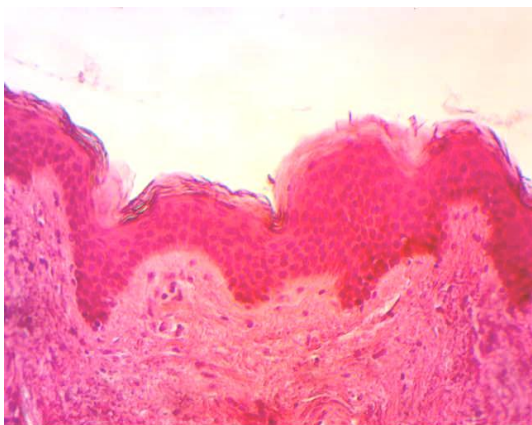
a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



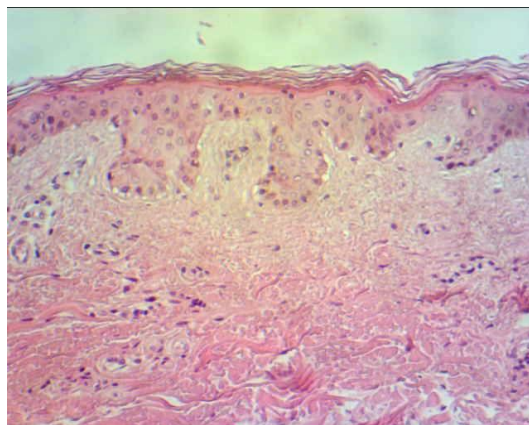
Графикон бр. 2. Просечна дебљина корнеалног слоја у испитиваним групама

5.1.8. Површина дермно-епидермног споја

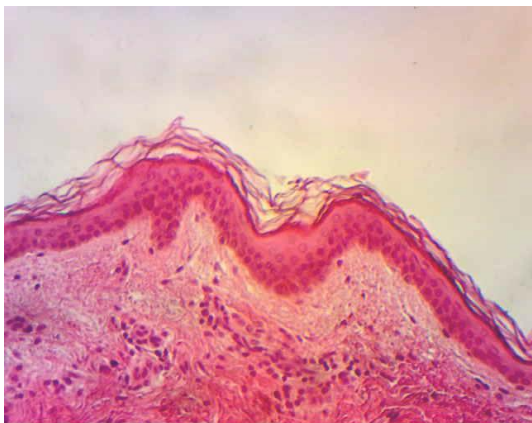
На хистолошким препаратима коже младих особа, јасно су детерминисана два слоја коже: епидермис и дермис, а граница између ова два подслоја је изразито неравна и таласаста. Дерм су увлачи у епидерм у виду бројних купастих изданака-папила, док се са друге стране епидерм пружа између папила, образујући епидермне гребене. Нема разлике између фотоекспониране и фотонеекспониране коже (сл. 51). Оваква хистолошка организација епидермно-дермалне границе, види се и у кожи средњег животног доба (сл. 52), а почетни губитак епидермних папила, као и благо заравњење епидермно-дермног споја региструје се на неким узорцима коже врата, у групи позног животног доба (сл. 53). На неким препаратима фотоекспониране коже позног и најстаријег животног доба, уочили смо неправилну пролиферацију епидермних пречки дубоко у дерм, уз ремећење уобичајене таласасте границе епидерма и дерма. Епидермне пречке су често задебљале на својим врховима и формирају мрежасту структуру (сл. 55, 56). Кожа старијих људи има изразитије стањивање епидермиса, примарно изазвано повлачењем епидермних гребенова (пречки) из дермиса, што доводи и до заравњивања епидермно-дермне границе, додирне површине између епидермиса и дермиса (сл. 54). Квантификација дермно-епидермног споја вршена је одређивањем површинске арее овог споја.



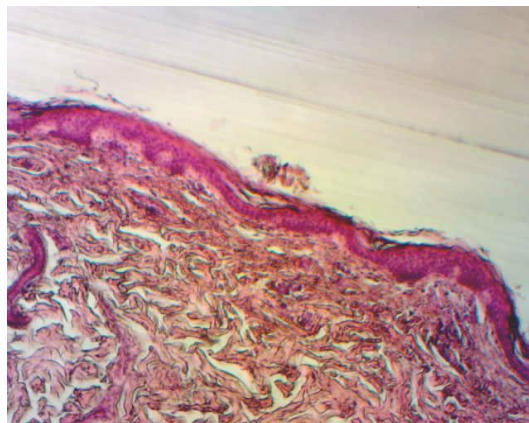
Сл. бр. 51. Нормална таласаста граница између епидерма и дерма, па самим тим и велика додирна површина. Младић 18г, кожа врата. НЕ 40х, камера 4х.



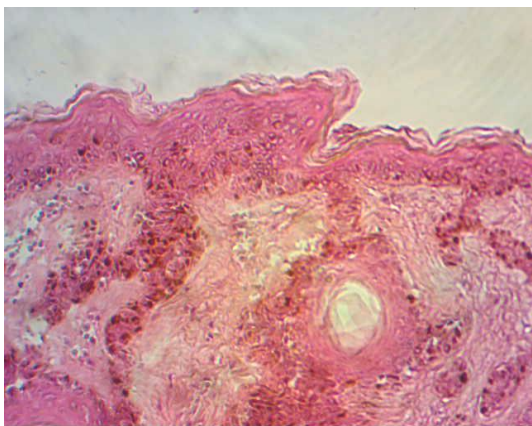
Сл. бр. 52. Још увек таласаста веза између епидермиса и дермиса. Мушкарац, 39г, кожа врата. НЕ 40х, камера 4х.



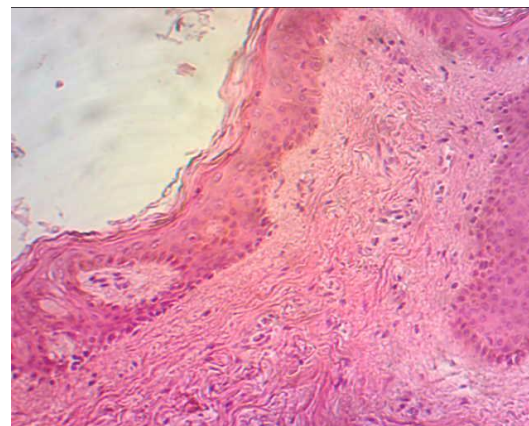
Сл. бр. 53. Губитак дермалних папила и заравњење епидермно-дермног споја. Жена, 55г, кожа врата. НЕ 40х, камера 4х.



Сл. бр. 54. Атрофија епитела и заравњење границе између епидерма и дерма. Жена, 67г, кожа стомака. НЕ 40х, камера 4х.



Сл. бр. 55. Неправилна, хаотична структура епидермних пречки које пролиферишу у дубину дерма. У њима су присутни бројни меланоцити. Мушкарац, 58г, кожа врата. НЕ 40х, камера 4х.



Сл. бр. 56. Епидермне пречке пролиферишу у дубину дерма, спајају се и формирају неправилну мрежасту структуру. Мушкарац, 81г, кожа врата. НЕ 40х, камера 4х.

Мерењем, употребом *ImageJ* програма, установљено је да површина арее дермно-епидермног споја коже врата у групи новорођенчади износи $0.0392 \pm 0.00331 \text{ mm}^2$. Са узрастом се повећава површина овог споја тако да у групи раног животног доба, његова вредност износи просечно $0.0436 \pm 0.00469 \text{ mm}^2$, а своју максималну вредност достиже у групи особа старости од 21 до 40 година, где износи $0.0462 \pm 0.00628 \text{ mm}^2$. Са даљом узрасном прогресијом долази до снижавања ове вредности (група позног животног доба) на $0.0375 \pm 0.00739 \text{ mm}^2$ и $0.0198 \pm 0.00553 \text{ mm}^2$ у групи најстаријих.

Кожа стомака има сличан тренд раста и опадања површине дермно-епидермне арее. У групи новорођенчади она има вредност $0.0410 \pm 0.00464 \text{ mm}^2$, код раног животног доба $0.0447 \pm 0.00382 \text{ mm}^2$ и у групи средњег животног доба $0.0513 \pm 0.00442 \text{ mm}^2$. Особе позног животног доба имају нешто мању површину од $0.0435 \pm 0.00237 \text{ mm}^2$, која у групи најстаријих још више опада и достиже ниво од $0.0255 \pm 0.00433 \text{ mm}^2$ (Табела бр.3; Графикон бр.3).

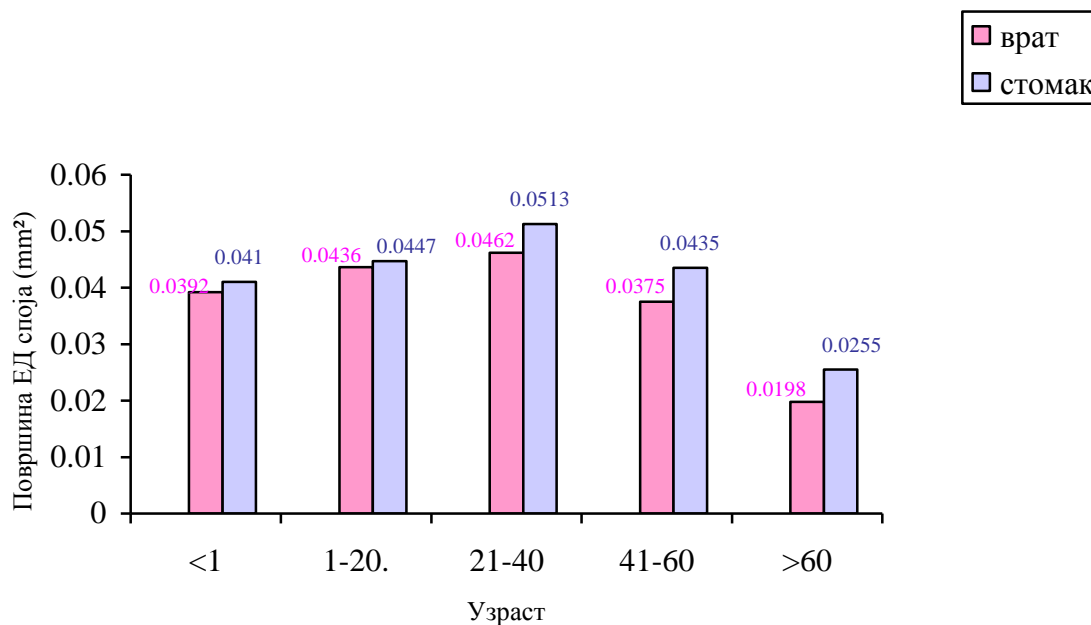
Статистичка анализа показује да разлика између средње вредности површине дермно-епидермног споја коже врата и стомака новорођенчади није статистички сигнификантна. Група раног животног доба има значајно више вредности ове површине и на кожи врата и на кожи стомака ($P < 0,05$; $P < 0,05$) у односу на групу новорођенчади. У оквиру групе раног животног доба се не бележи разлика у односу на регију коже. Особе средњег животног доба такође имају статистички више вредности површине дермно-епидермног споја у односу на групу раног животног доба на кожи стомака ($P < 0,05$). У групи средњег животног доба постоје разлике између површине дермно-епидермног споја коже врата и коже стомака са већом вредношћу на кожи стомака ($P < 0,01$). Група особа позног животног доба има статистички значајно ниже вредности површине дермно-епидермног споја и на кожи врата и на кожи стомака у односу на особе средњег животног доба ($P < 0,001$; $P < 0,001$), а статистичка значајност се бележи и у односу на регион коже у оквиру саме групе, са већом вредношћу на кожи стомака ($P < 0,01$). Група најстаријих има статистички сигнификантно нижу вредност у односу на позно животно доба и на кожи врата и на кожи стомака ($P < 0,001$; $P < 0,001$). Статистички значајно мања вредност се региструје на кожи врата у односу на кожу стомака у самој групи најстаријих ($P < 0,001$).

Табела бр. 3. Површина дермно-епидермног споја коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (μm^2)		врат vs стомак	Кожа стомака (μm^2)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	39200.68	3310.58		40997.34	4636.24
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	43611.12 a*	4686.94		44716.42 a*	3817.24
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	46214.42	6277.32	**	51309.32 б*	4422.22
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	37471.96 c***	7387.18	**	43492.6 c***	23686.78
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	19756.7 d***	5525.74	***	25486.84 d***	4327.46

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$

a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон бр. 3. Површина дермно-епидермног споја у испитиваним групама

5.1.9. Општа организација и дебљина дерма

Општа организација дерма анализирана је појединачно у хистолошкој анализи за свако узрасно доба, а сама процена о дебљини дерма у таквој анализи готово да и није могућа. Зато смо употребом *Image J* програма квантификовали дебљину дерма за сваку групу, а и унутар самих група појединачно, за регију врата и стомака.

Морфометријска студија коже врата показује да је дебљина дерма најмања у кожи беба $1278.25 \pm 56.79 \mu\text{m}$, а највећа у групи средњег животног доба, где просечно износи $1965.71 \pm 193.12 \mu\text{m}$. У групи раног животног доба, дерм коже врата има просечну вредност $1523.20 \pm 173.18 \mu\text{m}$, у групи позног животног доба, $1828.34 \pm 166.91 \mu\text{m}$, а у групи најстаријих $1535.15 \pm 188.72 \mu\text{m}$.

Дерм коже стомака је најтањи код беба $1290.17 \pm 52.31 \mu\text{m}$, расте на ниво од $1491.32 \pm 185.28 \mu\text{m}$ у кожи раног животног доба и $1632.43 \pm 208.14 \mu\text{m}$ у кожи особа средњег животног доба. Након раста, код особа старости од 41 до 60 година има тренд опадања и просечно износи $1456.21 \pm 196.27 \mu\text{m}$, што се наставља и у групи најстаријих где је вредност $1238.62 \pm 178.47 \mu\text{m}$ (Табела бр. 4; Графикон бр. 4).

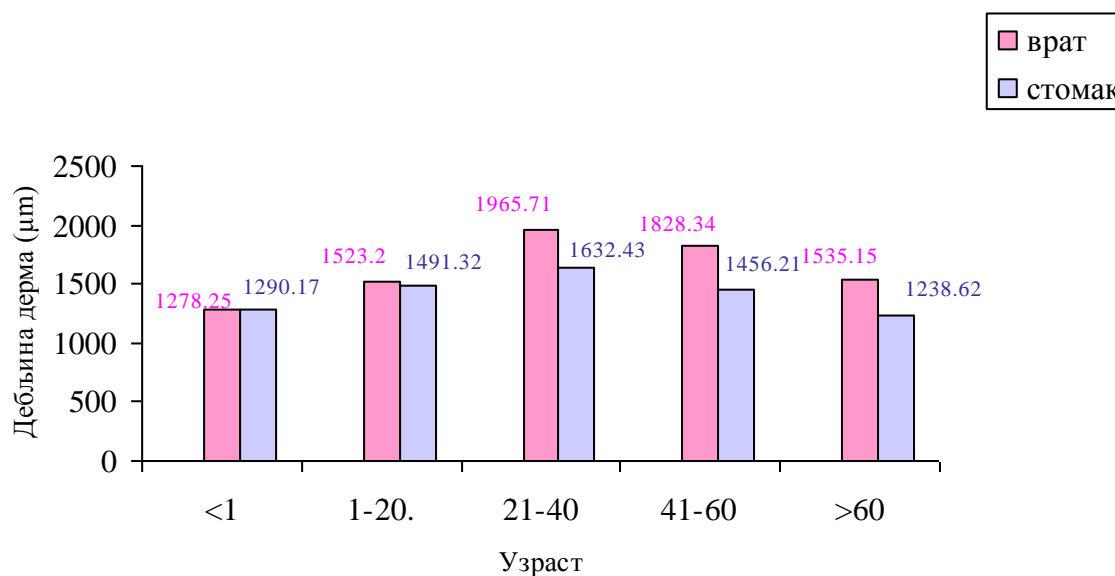
Статистичка анализа показује да не постоји значајна разлика у дебљини дерма између коже врата и стомака новорођене деце. У односу на кожу беба група раног животног доба има значајно дебљи дерм и на врату ($P < 0,001$) и на стомаку ($P < 0,001$). У оквиру групе раног животног доба нема значајне разлике између дебљине дерма коже врата и коже стомака. Дерм коже групе средњег животног доба (21-40 г) је значајно дебљи у односу на кожу врата ($P < 0,001$) и кожу стомака ($P < 0,05$) раног животног доба. Статистичка анализа показује да у групи средњег животног доба постоји значајна разлика у дебљини дерма коже врата и коже стомака и да је он дебљи у кожи врата ($P < 0,001$). Група позног животног доба (41-60 г) има статистички значајно тањи дерм у односу на групу средњег животног доба и на стомаку ($P < 0,01$) и на врату ($P < 0,05$). У оквиру саме групе се евидентира значајно дебљи дерм на кожи врата ($P < 0,001$). Дерм коже најстаријих је значајно тањи у односу на групу позног животног доба и на врату ($P < 0,001$) и на стомаку ($P < 0,001$), а разлика постоји и између регије врата и стомака у оквиру саме групе најстаријих, са дебљим дермом у кожи врата ($P < 0,001$).

Табела бр. 4. Дебљина дерма у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (μm)		врат vs стомак	Кожа стомака (μm)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	1278.25	56.79		1290.17	52.31
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	1523.20 a***	173.18		1491.32 a***	185.28
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	1965.71 б***	193.12	***	1632.43 б*	208.14
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	1828.34 с*	166.91	***	1456.21 с**	196.27
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	1535.15 d***	188.72	***	1238.62 d***	178.47

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$

a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон бр. 4. Дебљина дерма у испитиваним групама

5.1.10. Морфометријско одређивање дебљине коже

Укупну дебљину коже смо добили насумичним избором по 3 различита места на сваком од хистолошких препарата где смо мерили дебљину сваког од подслојева коже (дерм, вијабилни епидерм и корнеални слој), а потом их сабрали.

Морфометријска студија коже врата показује да је укупна дебљина коже најмања у кожи беба, $1426.28 \pm 76.91 \mu\text{m}$, а највећа у групи позног животног доба, где просечно износи $2754.47 \pm 329.12 \mu\text{m}$. У групи раног животног доба, укупна дебљина коже врата има просечну вредност $1836.43 \pm 198.76 \mu\text{m}$, у групи средњег животног доба, $2579.12 \pm 267.69 \mu\text{m}$, а у групи најстаријих $1884.49 \pm 244.68 \mu\text{m}$.

Кожа стомака је најтања код беба $1399.08 \pm 65.43 \mu\text{m}$, расте на ниво од $1794.55 \pm 201.45 \mu\text{m}$ у раном животног добу и $2367.31 \pm 241.29 \mu\text{m}$ код особа средњег животног доба. Након раста, код особа старости од 41 до 60 година има тренд опадања и просечно износи $2165.19 \pm 214.88 \mu\text{m}$, што се наставља и у групи најстаријих где је вредност $1517.87 \pm 210.73 \mu\text{m}$ (Табела бр. 5; Графикон бр. 5).

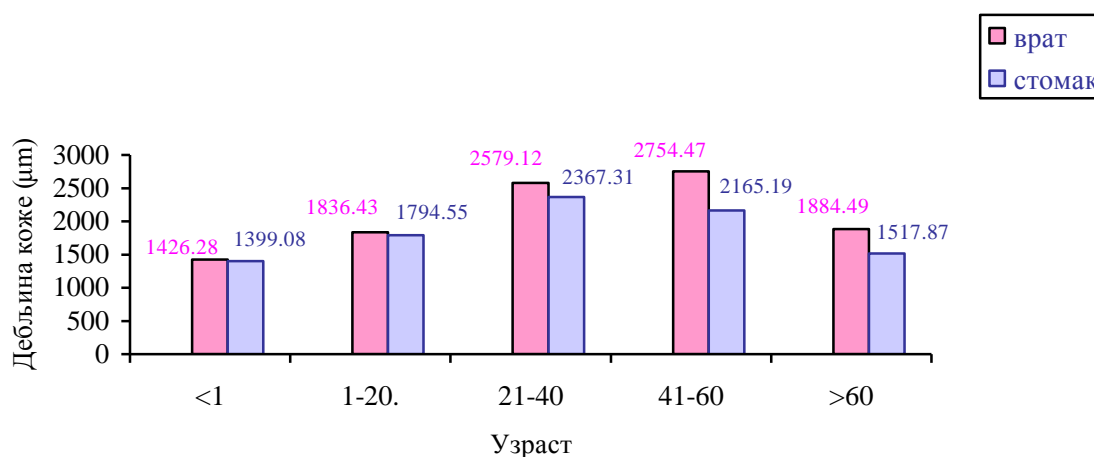
Статистичка анализа показује да не постоји значајна разлика у укупној дебљини коже врата и стомака новорођене деце. У односу на кожу беба, група раног животног доба има значајно дебљу кожу и на врату ($P < 0,001$) и на стомаку ($P < 0,001$). У оквиру групе раног животног доба нема значајне разлике између укупне дебљине коже врата и коже стомака. Кожа групе средњег животног доба је значајно дебља у односу на кожу врата ($P < 0,001$) и кожу стомака ($P < 0,05$) раног животног доба. Статистичка анализа показује да у групи средњег животног доба постоји значајна разлика у дебљини коже врата и коже стомака и да је она дебља на врату ($P < 0,001$). Група позног животног доба има статистички значајно тању кожу стомака у односу на групу средњег животног доба ($P < 0,01$). У оквиру саме групе се евидентира значајно дебља кожа на врату ($P < 0,001$). Укупна дебљина коже најстаријих је значајно тања у односу на групу позног животног доба и на врату ($P < 0,001$) и на стомаку ($P < 0,001$), а разлика постоји и између регије врата и стомака у оквиру саме групе најстаријих, са већом вредношћу за кожу врата ($P < 0,001$).

Табела бр. 5. Укупна дебљина коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (μm)			Кожа стомака (μm)		
		\bar{X}	SD	врат vs стомак	\bar{X}	SD	%
0 група (фет / д. нов)	10	1426.28	76.91		1399.08	65.43	
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	1836.43 a***	198.76		1794.55 a***	201.45	
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	2579.12 b***	267.69	***	2367.31 b***	241.29	
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	2754.47	329.12	***	2165.19 c**	214.88	
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	1884.49 d***	244.68	***	1517.87 d***	210.73	

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон бр. 5. Укупна дебљина коже у испитиваним групама

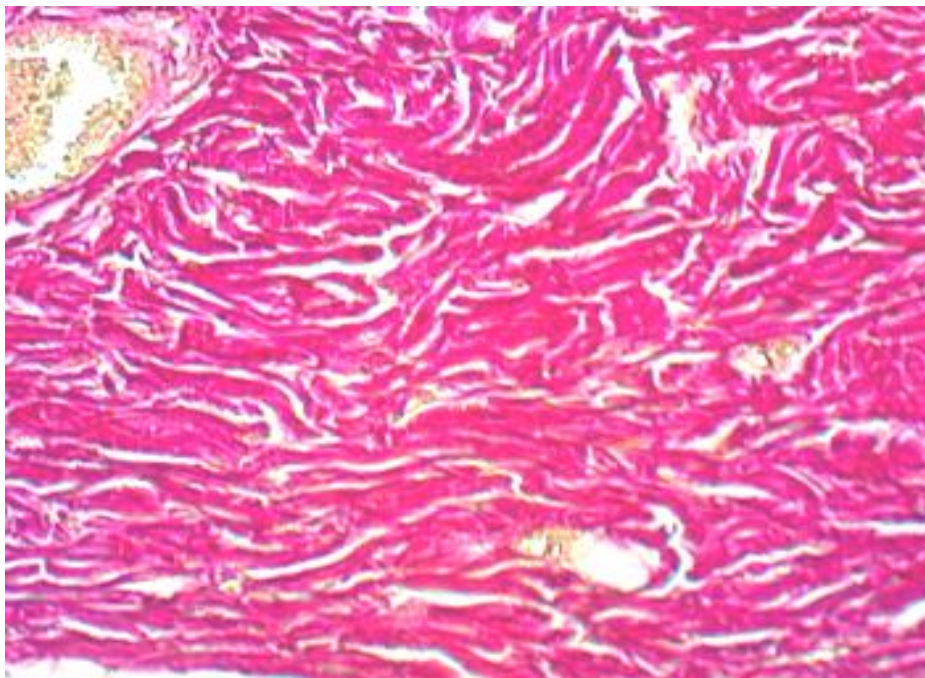
5.2. Хистохемијска анализа фотоекспониране и фотонеекспониране коже

5.2.1. Општа организација и заступљеност колагена

За идентификацију колагена коришћена је хистохемијска метода по *Van-Gieson*, којом се колаген боји црвено, док се остале везивоткивне структуре и епител боје жуто. При анализи ткивних узорака праћена је пријемчивост колагена за боје, начин организације колагених снопова, у смислу њихове густине, дужине,

дебљине, вијугавости и уздужне испруганости, односно упоређивана је структура, организација и густина колагена између група.

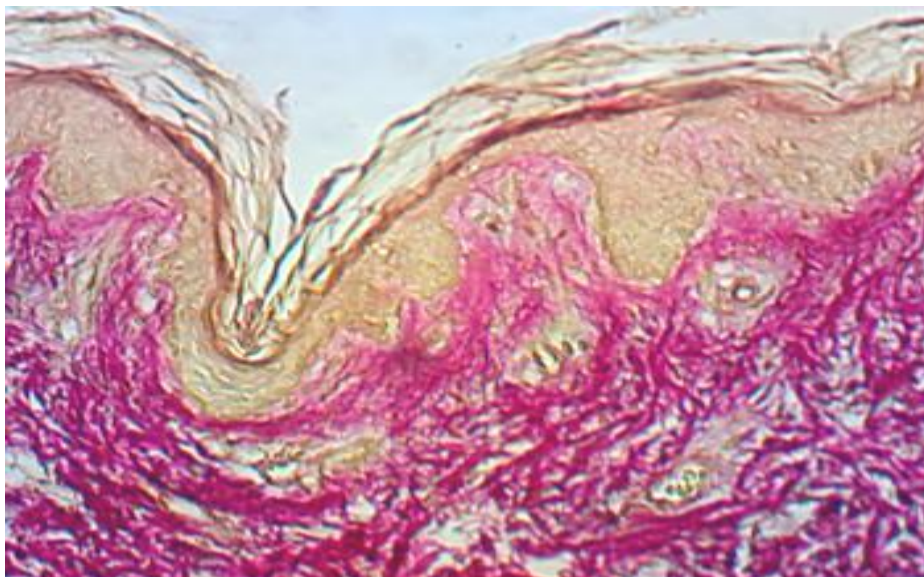
На препаратима новорођенчади, као и младе коже, узраста 1-20 година, и на фотоекспонираним и фотонеекспонираним регијама, снопови колагена су дебели, вијугави, пријемчиви за боје и показују попречну испруганост. Усмерени су у различитим правцима тако да се виде на уздужном, попречном или косом пресеку (сл. 57).



Сл. бр. 57. Дебели, вијугави снопови, зрелог колагена, усмерени у различитим правцима, заузимају највећи део волумена дерма. Девојчица, 8 година, кожа стомака. Van-Gieson, 400X, камера 4x.

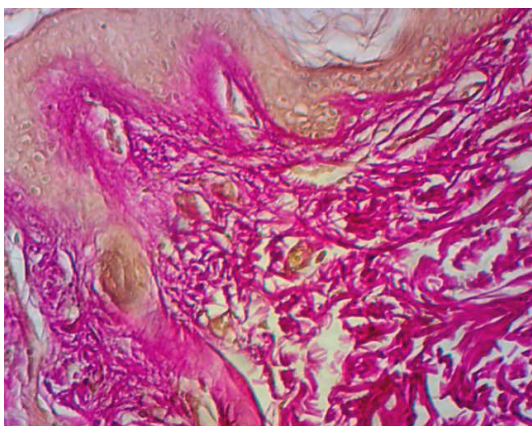
У папиларном слоју дерма снопови су танки, узани, растресити и усмерени углавном према површини епидерма. Папиларни слој дермиса има рахлу структуру у којој колагена влакна квантитативно преовлађују (сл. 58).

У ретикуларном слоју дерма снопови колагених влакана су дебели, често вијугави и усмерени у свим правцима. Дубоки дермис изгледа гушће од површног дермиса у коме се налази неорганизована и дезорјентисана мрежа влакана (сл. 57, 58).

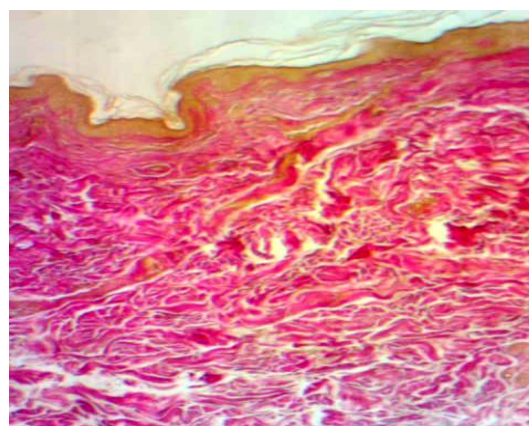


Сл. бр. 58. Снопови колагених влакана у ретикуларном слоју дебели и изукрштани, док су у папилама тањи и паралелни њиховој уздужној оси. Дечак, 6 година, кожа врата. Van-Gieson, 100X, камера 4x.

Узорци коже групе старости од 21-40 година имају сличану хистолошку слику колагене мреже и на кожи врата, и на кожи стомака. Колагена влакна су углавном очуване структуре, дискретно редукованог волумена, посебно на фотоекспонираној кожи. Дебели, вијугави снопови колагена, усмерени у различитим правцима, заузимају највећи део волумена дерма. Колагена влакна у доњем дермису су распоређена скоро паралелно са површином коже и јако су испреплетана. Афинитет за боје на свим узорцима које смо анализирали је био очуван. На неким узорцима се уочава нешто већи простор који припада екстрацелуларном матриксу (сл. 59, 60).

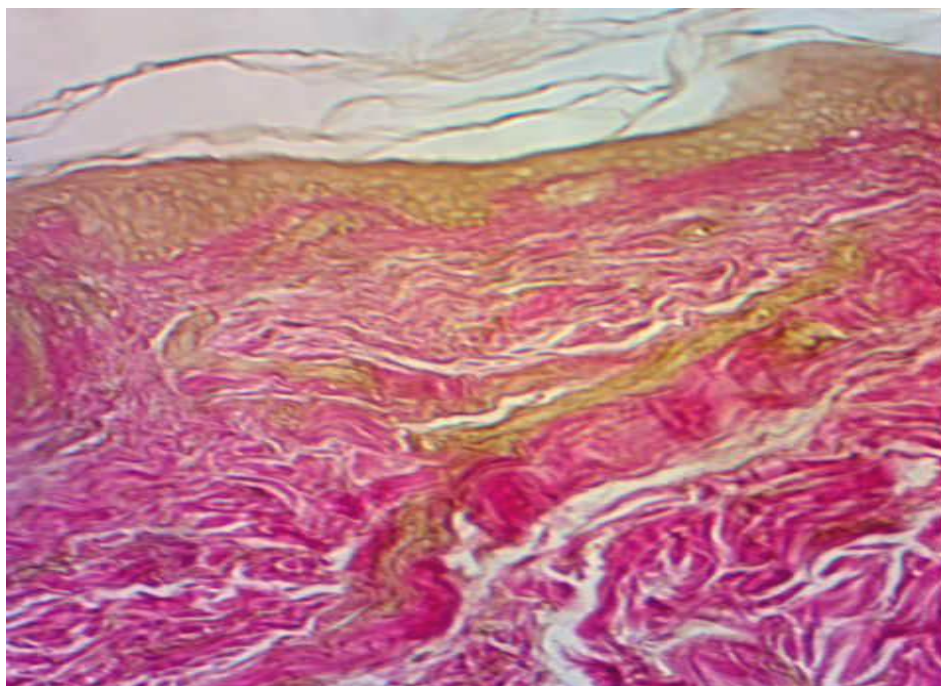


Сл. бр. 59. Дебели, вијугави снопови колагена, усмерени у различитим правцима, заузимају највећи део волумена дерма. Колагена влакна у доњем дермису су распоређена скоро паралелно са површином коже и јако су испреплетана. Жена, 25г, кожа стомака. Van-Gieson, 40x, камера 4x.



Сл. бр. 60. Таласасте, дебели колагени снопови, делимично испреплетани. Блага редукција влакана у појединим деловима дерма. Мушкарац, 35г, кожа врата. Van-Gieson, 40x, камера 4x.

Прве значајније промене, које смо уочили у хистолошкој анализи, појављују се након 40 година старости, тј. у групи позног животног доба, више на кожи врата, него на кожи стомака. Промене су у почетку исказане дискретно, а погођена су најтања влакана папиларног дермиса. Узани колагени снопови папиларног дермиса показују снижен афинитет за боју, што указује на то да су захваћени процесом колагенолизе. У појединим деловима запажа се потпуно одсуство колагена. Постепено смањење везивних влакана води постепеном смањењу густине папиларног дермиса, услед квантитативног смањења колагених влакана (сл. 62). Међутим, на неким препаратима смо уочили повећање густине колагених влакана у папиларном дерму, што је вероватно последица чињенице да лизом најпре страдају најтања колагена влакна, која скоро потпуно и нестају, а за то време само она која су мало дебљи остају, што донекле даје лажну слику повећане густине (сл. 63). Промењена колагена влакна папиларног дермиса се некада спајају и формирају слепљене плоче или поља, како у папиларном, тако и у ретикуларном дермису (сл. 61).



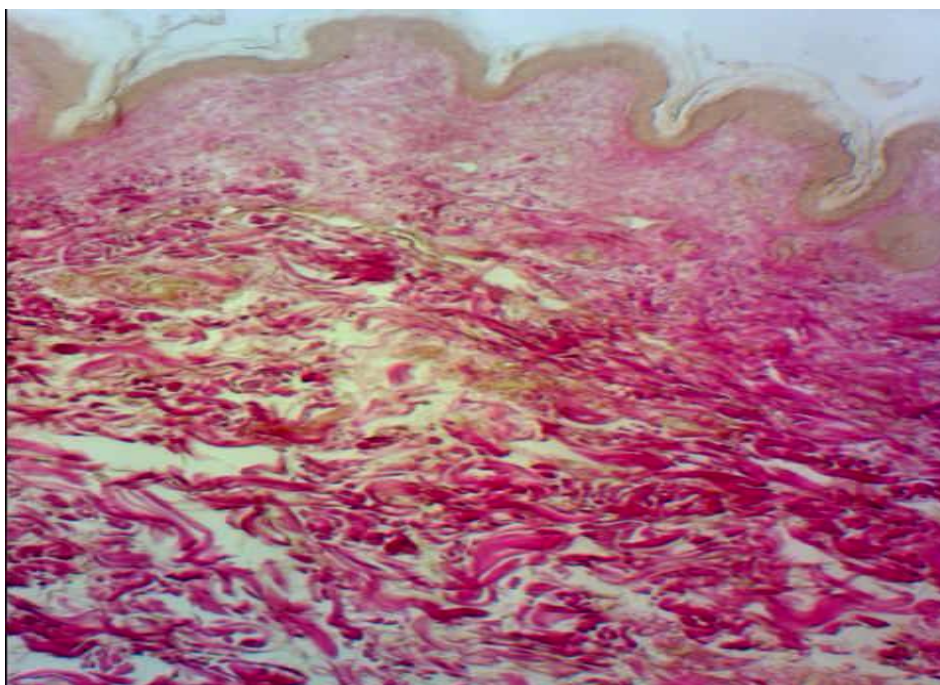
Сл. бр. 61. Таласасти, дебели колагени снопови, делимично испреплетани у ретикуларном дерму. Блага редукција влакана у појединим деловима дерма. Мушкарац, 50г, кожа врата. Van-Gieson, 100X, камера 4х.

Промене колагених влакана регистровали смо и на нивоу ретикуларног дерма, у виду згуснутих колагених влакана (сл. 61). Ретикуларни дермис у неким регијама дерма, садржи снопове колагена који су изразито дебели и пријемчиви за боје, док су у другим деловима танки, вијугави, местимично фрагментовани и мање пријемчиви за

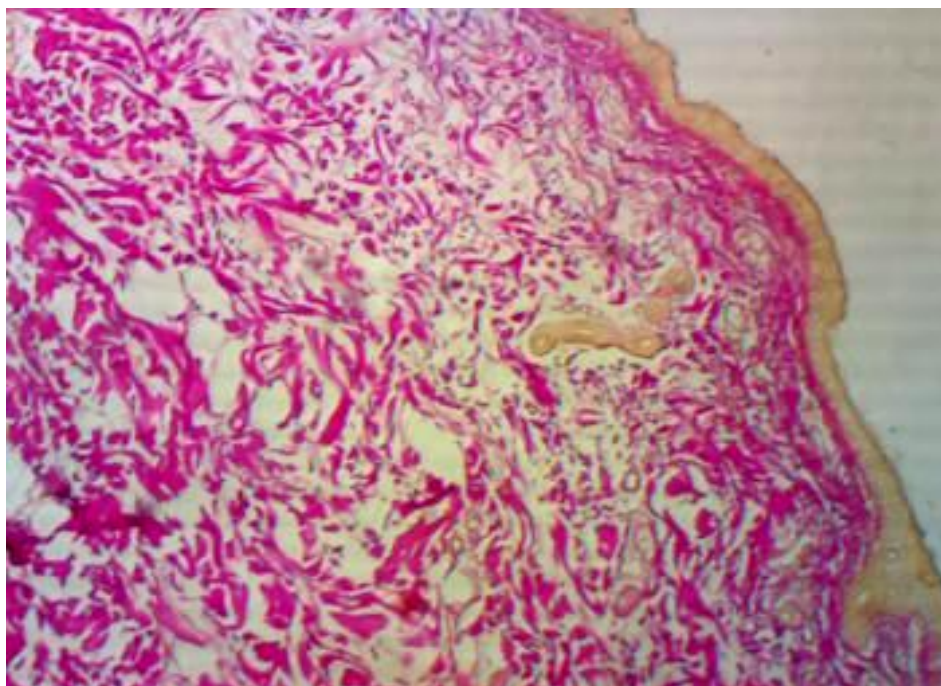
боју, што указује да су захваћени процесом колагенолизе (сл. 62). На неким узорцима, ретикуларни дерм садржи фрагментована колагена влакана, а у појединим регијама и потпуно лизирана (сл. 63). Овако лизирана колагена влакана, детерминишу изглед простора између преосталих влакана. Ови простори, који иначе припадају екстрацелуларном матриксу, су на неким узорцима мали, а на неким имају већу површину (сл. 63).

У очуваним колагеним сноповима преовлађују фиброцити, док су у оштећеним сноповима знатно бројнији фибробласти, што се може протумачити реактивном појавом у циљу надокнаде изгубљеног колагена.

У периваскуларним просторима колагени снопови су одсутни или тањи, вероватно услед компресије или лизе колагена (сл. 62, 63). У дерму коже која је била заштићена од сунца, групе позног животног доба, приметна је блага редукција колагених влакана. Начин организације и усмереност колагених влакана су и даље углавном правилни, уз незнатна одступања. Могу се видети кратки, танки, вијугави сегменти, али и уочити широке плоче, формиране од међусобно слепљених колагених влакана (сл. 74). Овакве промене постају израженије у групи најстаријих.

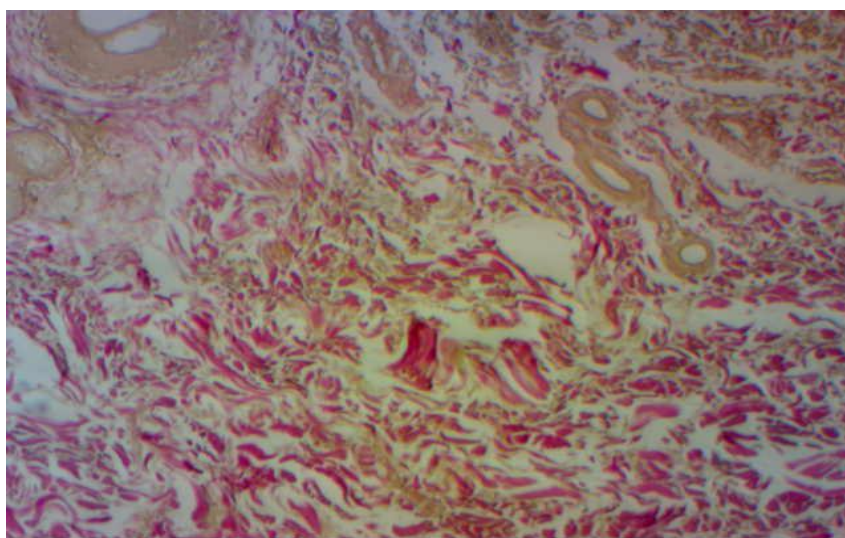


Сл. бр. 62. Нека од колагених влакана су делимично дегенерисана, нека изгледају нормално. Различита пријемчивост за боје. Соларна еластоza. Мушкарац, 58 г, кожа врата. Van-Gieson, 40x, камера 4x.



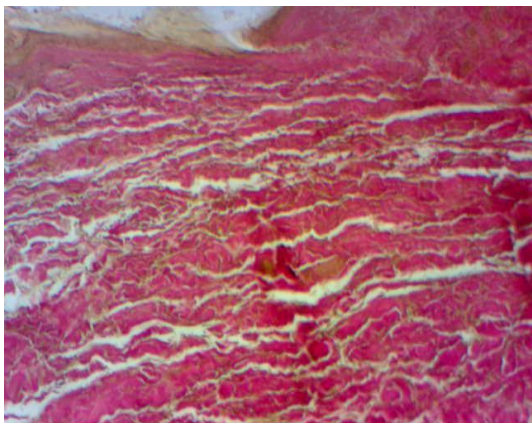
Сл. бр. 63. Колаген редукован, неуједначене пријемчивости за боје, понегде потпуно одсутан. Жена, 58г, кожа врата. Van-Gieson, 40х, камера 4х.

У кожи која је била заштићена од Сунца, особа најстаријег животног доба, приметно је да је колаген у основи јако редукован и да му количина и начин организације у многоме варирају. Могу се видети кратки, танки сегменти, а често се запажају остаци колагена у виду зрнастог материјала. Простор који припада екстрацелуларном матриксу је последично повећан (сл. 64). Међутим, без обзира која хистолошка слика доминира, ни на једном узорку нисмо имали утисак неуређености и дезорганизованости, каква се види на фотекспонираној кожи.

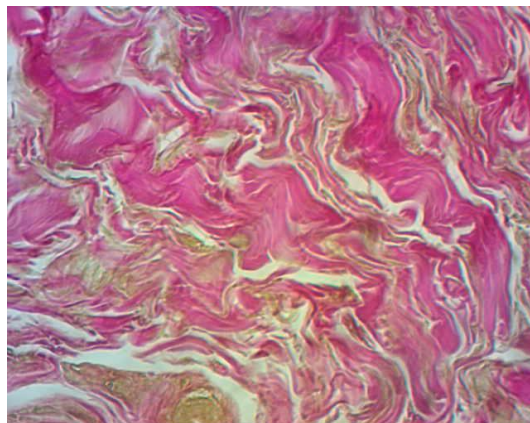


Сл. бр. 64. Виде се кратки, танки сегменти и остаци колагена у виду зрнастог материјала, са подручјима комплетне дегенерације колагена и повећањем простора који припада ЕЦМ-у. Мушкарац, 82 г, кожа стомака. Van-Gieson, 40х, камера 4х.

У ретикуларном дерму могу се уочити и широке плоче, формиране од међусобно слепљених колагених влакана.

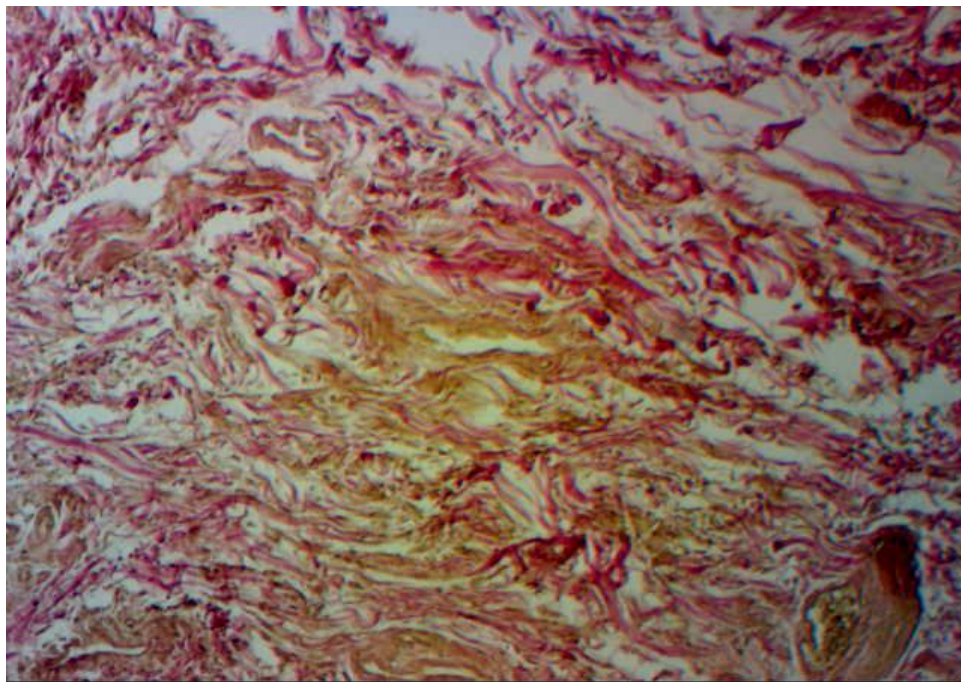


Сл. бр. 65. Колагени снопови у форми широких плоча. Жена, 68г, кожа стомака Van-Gieson, 100X, камера 4х.

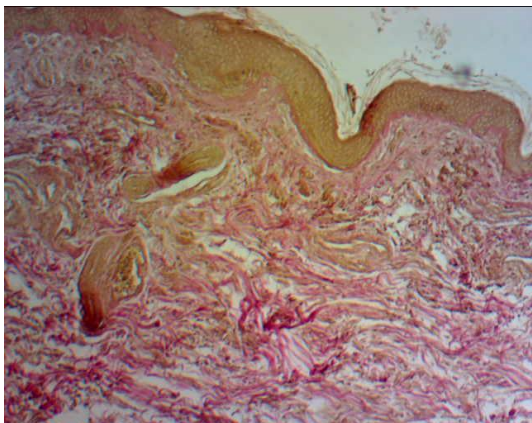


Сл. бр. 66. Колагени снопови у доњем дермису изгледају набrekli и хомогени. Мушкарац, 73г, кожа стомака. Van-Gieson, 400X, камера 4х.

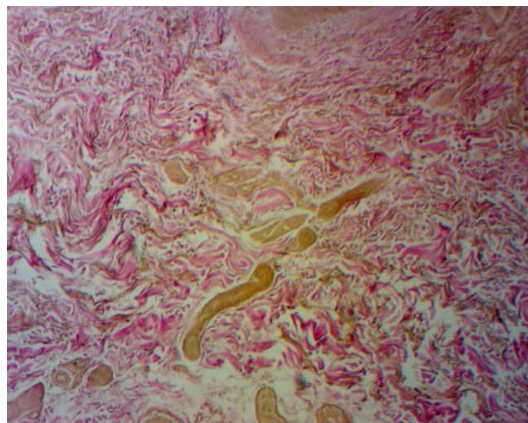
На препаратима фотоекспониране коже особа старијих од 60 година запажа се да су колагена влакна краћа, тања, дезорганизована, често фрагментисана. Узани колагени снопови показују снижен афинитет за боју, што указује на то да су захваћени процесом колагенолизе. У појединим жариштима запажа се потпуно одсуство колагена (сл. 67, 68, 69, 70, 71). Између колагених снопова налазе се крвни судови (пријемчиви за жуту боју) и периваскуларни простори (сл. 69, 70, 71).



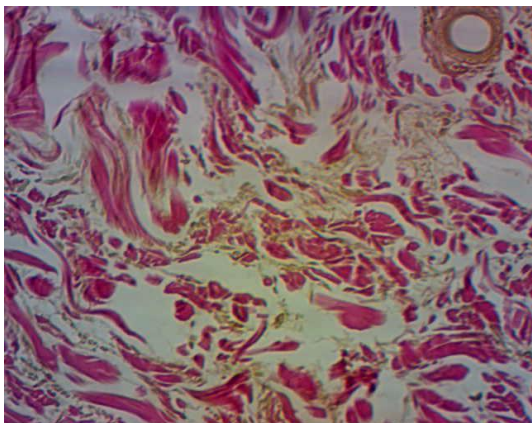
Сл. бр. 67. Изразито неправилан распоред колагених снопова, са подручјима комплетне дегенерације колагена и повећањем простора који припада ЕЦМ-у. Мушкарац, 79г, кожа врата. Van-Gieson 100X, камера 4х.



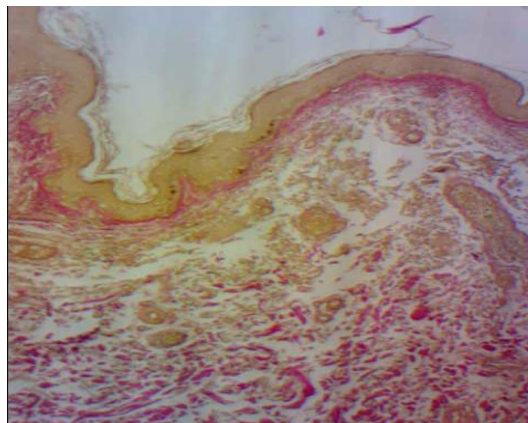
Сл. бр. 68. Колаген изгледа неправилно распоређен у снопове који се делимично преплићу и анастомозирају. Мушкарац, 73г, кожа врата. Van-Gieson, 40х, камера 4х. Van-Gieson. 100X. камера 4х.



Сл. бр. 69. Колагена влакна неуређена, фрагментована, неуједначеног афинитета за боје. Жена, 68г, кожа врата. Van-Gieson, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 70. Због континуираног процеса дегенерације и регенерације колагена влакна и снопови се пружају у разним смеровима, што има за последицу дезорганизацију колагена. Жена 77г, кожа врата. Van-Gieson, 100х, камера 4х.



Сл. бр. 71. Велики фокус комплетне дегенерације (деградације) колагена у горњем слоју ретикуларног дерма. Жена 77г, кожа врата. Van-Gieson, 40х, камера 4х.

Стереолошким истраживањем и статистичком обрадом података нађено је да средња вредност волуменске густине (ВГ) колагена у кожи врата новорођенчади износи $80.23 \pm 11.92\%$, а у кожи стомака $81.03 \pm 11.86\%$ и да та разлика није статистички сигнификантна. Код раног животног доба ВГ колагена коже врата износи $77.61 \pm 13.47\%$, а коже стомака $78.12 \pm 12.15\%$ и значајно се не разликује у односу на кожу новорођенчади, кожу средњег животног доба и у оквиру саме групе према регији фотоекспонираности коже (табела бр. 6; графикон бр. 6). ВГ колагена у кожи групе средњег животног доба нема статистичку сигнификантност у односу на регију коже. Вредност ВГ колагена коже врата позног животног доба је значајно нижа него у кожи средњег животног доба ($P < 0,05$), а и у оквиру саме групе су значајно веће на

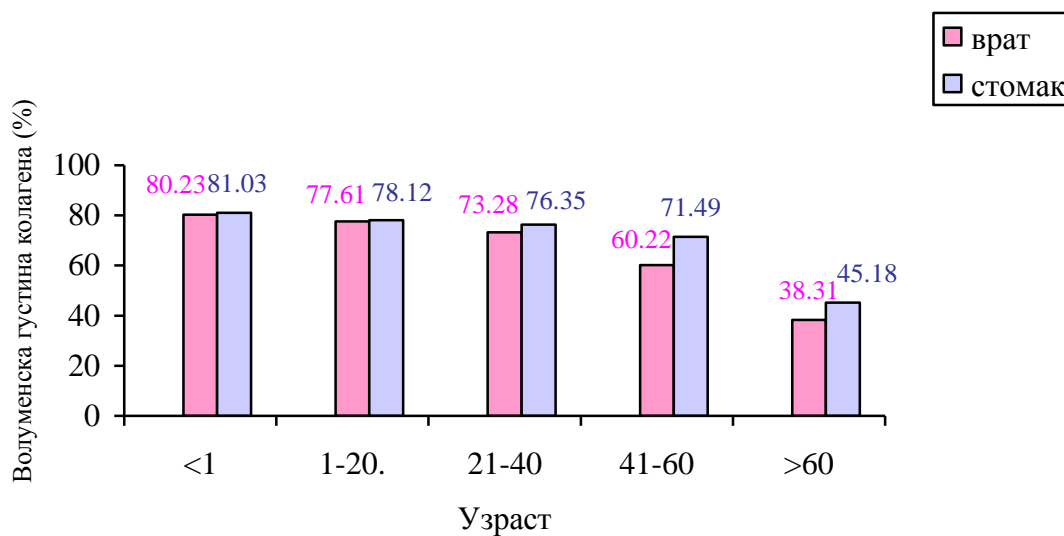
кожи стомака ($P<0,05$). Кожа најстаријих има значајно ниже вредности ВГ и на регији врата и на регији стомака у односу на кожу позног животног доба ($P<0,001$), а евидентира се и већа вредност ВГ у оквиру саме групе у кожи стомака ($P<0,05$).

Табела бр. 6. Волуменска густина колагена у кожи испитиваних група

Група	N	Кожа врата (%)		врат vs стомак	Кожа стомака (%)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	80.23	11.92		81.03	11.86
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	77.61	13.47		78.12	12.15
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	73.28	14.63		76.35	14.21
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	60.22 с*	16.24	*	71.49	17.28
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	38.31 d***	11.05	*	45.18 d***	9.23

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

а - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



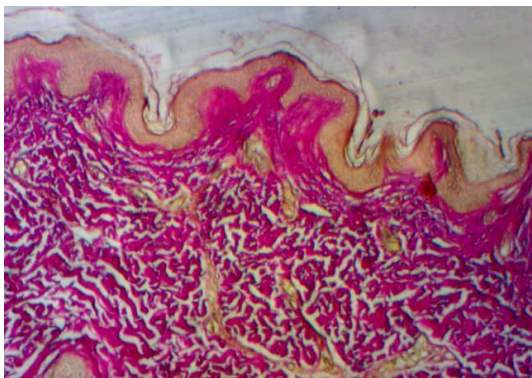
Графикон бр. 6. Волуменска густина колагена у кожи испитиваних група

5.2.2. Општа организација и заступљеност васкуларне мреже

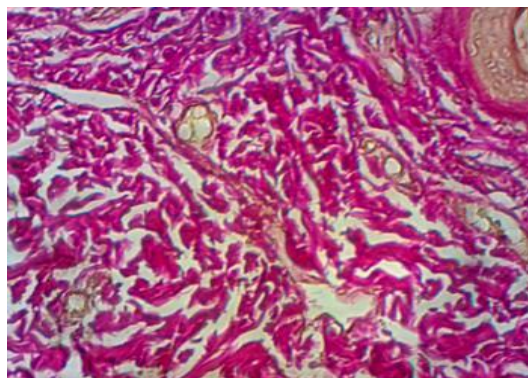
Бојењем *Van Gieson* хистохемијском методом, поред колагена, који се боји ружичасто, детерминисали смо крвне судове у дерму, који се боје жуто.

Кожа фетуса и новорођенчади садржи богату капиларну мрежу. Обиље капилара, танких зидова види се и у групи младих, посебно код оних млађег узраста и на кожи врата и на кожи стомака (сл. 72). Хистолошка анализа показују да узорци коже млађих од 40 година, који имају нормалну грађу дермиса, имају и добро развијену васкуларну мрежу, без обзира да ли је у питању фотоекспонирана или фотонеекспонирана кожа. Површински дермис је добро васкуларизован и садржи бројне мале крвне судове, посебно у областима коже која има дебљи епидермис (сл. 73). Приметили смо да папиларни дермис код кога смо запазили промене на колагеним и ретикуларним влакнима, показује и промене у микроваскулатури. Ово се види на узорцима коже старијих од 40 година (група позног и најстаријег животног доба) и на кожи врата и на кожи стомака, који имају добро развијену васкуларну мрежу, нормалне грађе, али са нешто мањим пречницима крвних судова. Такође смо приметили да васкуларна мрежа у папиларном дермису, остаје непромењена, чак и у најстаријем животног добу, односно, да све док папиларни дермис има папилари аспект, остаје и релативно добро васкуларизован, без обзира на животно доба. На узорцима коже, који су изгубили дермалне папиле и општи аспект папиларности, папиларни дермис је тањи, а има се утисак да је васкуларна мрежа проређена. Крвни судови се смањују не само у величини, већ и бројчано, што је посебно изражено на кожи врата позног и најстаријег животног доба. У узорцима коже врата позног животног доба, крвни судови су мали и ретки, односно бројчано смањени (сл. 74). Узорци коже најстаријег животног доба, посебно фотоекспониране регије, показују промене у дебљини зида капилара и мањих крвних судова, заравњивање и задебљање *laminae elastice interne*. На неким узорцима се види повећање васкуларне пропустљивости, са појавом интерфибриларног едема који је углавном изражен периваскуларно (сл. 75, 77). Такође смо уочили да је лумен неких крвних судова много шири, што сугерише стазу. Истовремено се види да је интерфибриларни едем повећан у подручју које исхрађује одговарајући крвни суд (сл. 75, 77). Дегенеративни процеси који захватају крвне судове вероватно не мењају све крвне судове у исто време, тако да се могу видети крвни судови са нормалном структуром, али и они са

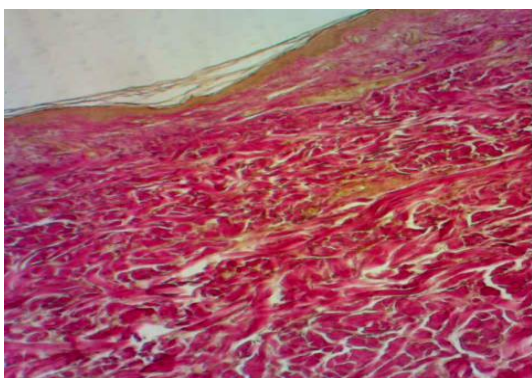
веома израженим алтерацијама. Такође смо приметили да су најмањи крвни судови, са најтањим зидовима, највише изложени структурним променама. Наше истраживање показује да су алтеративни процеси такође примећени у случају неких крвних судова већег калибра, са дебљим зидовима (сл. 76, 77).



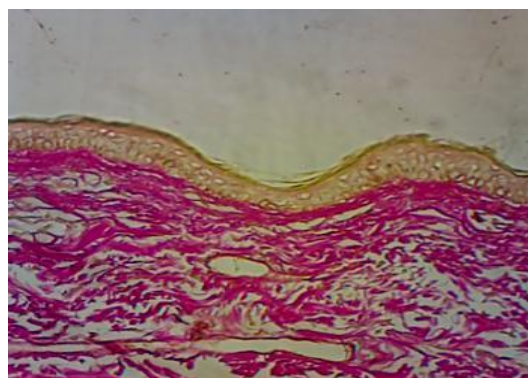
Сл. бр. 72. Богата капиларна мрежа у кожи Девочица, 2 године, кожа врата. Van-Gieson, 40x, камера 4x.



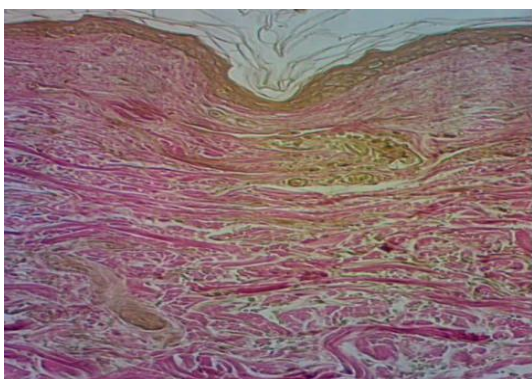
Сл. бр. 73. Добро васкуларизован дермис. Мушкарац, 23г, кожа стомака. Van-Gieson, 100X, камера 4x.



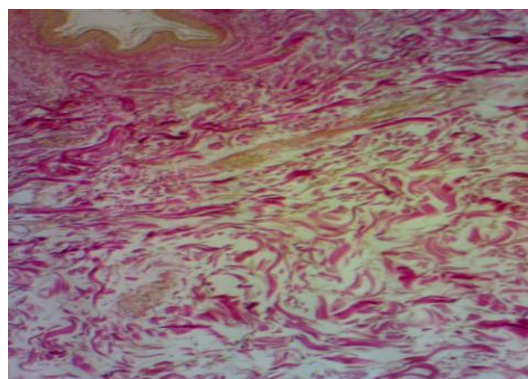
Сл. бр. 74. У дерму се види нешто мањи број крвних судова, мањег пречника. Жена, 43г, кожа врата. Van-Gieson, 40x, камера 4x.



Сл. бр. 75. Велики број крвних судова, танких зидова са широким луменом, што сугерише стазу. Жена 67г, кожа врата. Van-Gieson, 40x, камера 4x.



Сл. бр. 76. Редукована микроваскуларна мрежа. Интерфбриларни едем. Мушкарац, 71г, кожа стомака. Van-Gieson, 40x, камера 4x.



Сл. бр. 77. Проређена мрежа крвних зидова, танких зидова и широког лумена у ретикуларном дерму. Мушкарац, 77г, кожа врата. Van-Gieson, 40x, камера 4x.

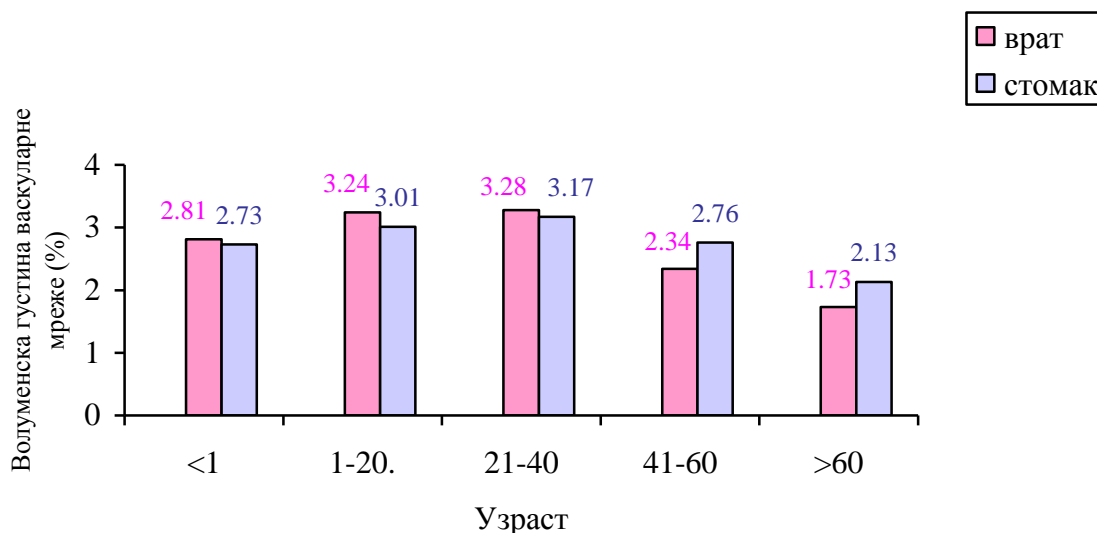
Стереолошким истраживањем и статистичком обрадом података нађено је да средња вредност волуменске густине (ВГ) васкуларне мреже у кожи врата новорођенчади износи $2.81 \pm 0.38\%$, а у кожи стомака $2.73 \pm 0.26\%$ и да та разлика није статистички сигнификантна. Код коже раног животног доба ВГ васкуларне мреже коже врата износи $3.14 \pm 0.41\%$ и значајно је већа у односу на кожу врата новорођене деце ($P < 0,05$). Кожа стомака групе раног животног доба има већу вредност ($3.01 \pm 0.32\%$) у односу на кожу стомака новорођенчади ($P < 0,05$), а у оквиру саме групе разлика ВГ васкуларне мреже, коже врата и коже стомака, није статистички значајна (Табела бр. 7; Графикон бр. 7). ВГ васкуларне мреже, у кожи врата и стомака групе средњег животног доба, има сличну вредност као кожа раног животног доба, а не постоје ни регионалне разлике. Вредности ВГ васкуларне мреже, и коже врата и коже стомака у позном животном добу су значајно ниже него у кожи средњег животног доба ($P < 0,001$; $P < 0,001$), а и у оквиру саме групе су значајно веће на кожи стомака ($P < 0,05$). Кожа најстаријих има значајно ниже вредности ВГ васкуларне мреже и на регији врата и на регији стомака у односу на кожу позног животног доба ($P < 0,001$; $P < 0,001$), а евидентира се и већа вредност ВГ васкуларне мреже у оквиру саме групе у кожи стомака ($P < 0,01$).

Табела бр. 7. Волуменска густина васкуларне мреже коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (%)		врат vs стомак	Кожа стомака (%)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	2.81	0.38		2.73	0.26
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	3.14 а*	0.41		3.01 а*	0.32
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	3.28	0.38		3.17	0.21
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	2.34 с***	0.47	*	2.76 с***	0.36
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	1.73 д***	0.33	**	2.13 д***	0.29

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$

а - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, д- vs позно ж.д.



Графикон бр. 7. Волуменска густина васкуларне мреже коже у испитиваним групама

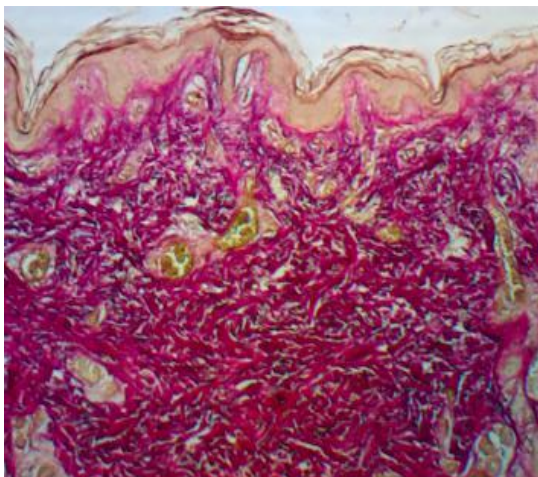
5.2.3. Општа организација и заступљеност основне супстанце у екстрацелуларном матриксу

Основну супстанцу екстрацелуларног матрикса дерма смо детерминисали индиректно, на препаратима бојеним *HE* и *Van Gieson* техником, као празан простор који се не боји. Имали смо у виду да постојећа техничка решења у обради препарата могу резултовати нешто већим обимом ових простора, услед промене (скврчавање) ткива приликом фиксације, а који нису научно детерминисани као код неких ткива, па због тога ове резултате узимамо са неким нивом резерве.

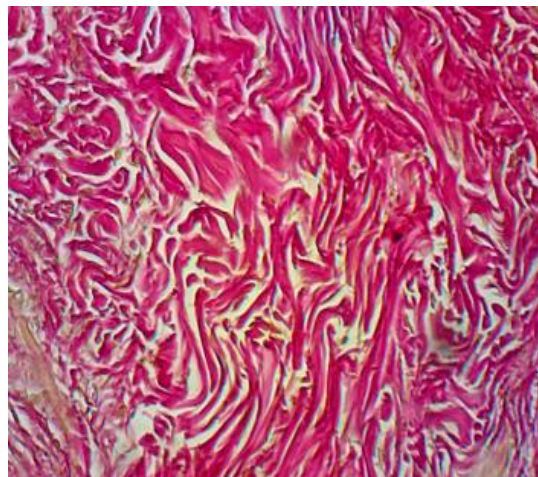
У кожи новорођенчади и младих види се веома мали простор који припада основној супстанци екстрацелуларног матрикса дерма (сл. 78). Оваква хистолошка организација остаје очувана и у средњем животном добу и на кожи врата и на кожи стомака (сл. 79). Упоредо са прогресијом смањења количине колагених влакана, која се почетно региструје у кожи позног животног доба, запажа се повећање простора који припада основној супстанци екстрацелуларног матрикса дерма, тако да је он обрнуто пропорционалан количини колагених влакана у дермису (сл. 80, 81).

На појединим узорцима коже врата, позног и најстаријег животног доба, код којих се региструју конфлуентна запаљењска жаришта, а на местима где се жаришта стапају, примећују се да су снопови колагена сведени на узане траке или мрежасте

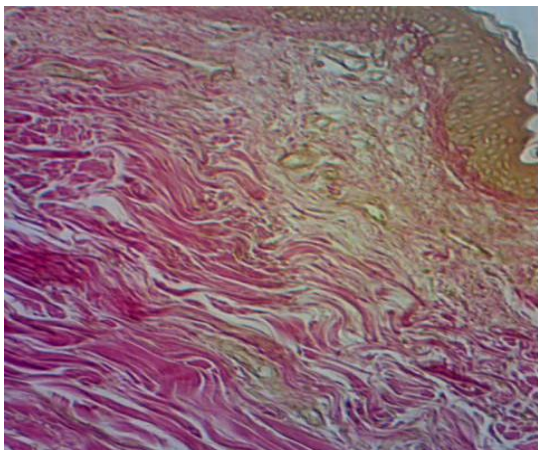
структуре, а да је простор који припада основној супстанци, повећан. Узани колагени снопови показују снижен афинитет за боју, што указује на то да су захваћени процесом колагенолизе. У појединим жариштима запажа се потпуно одсуство колагена са великим простором у виду острваца која припадају основној супстанци екстрацелуларног матрикса (сл. 80, 81).



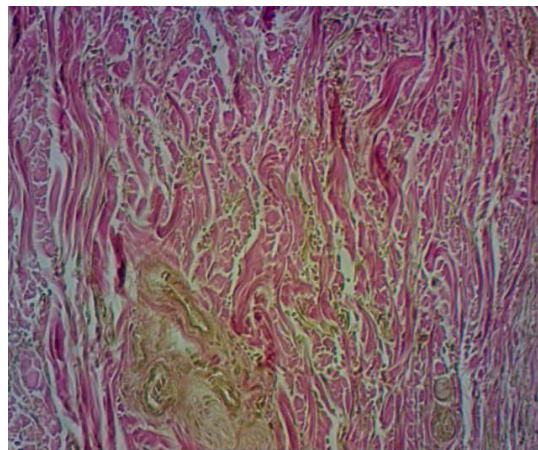
Сл. бр. 78. Мали простор који припада основној супстанци. Кожа новорођенчета. Van-Gieson, 40x, камера 4x.



Сл. бр. 79. Основна супстанца заузима мали простор између богате мреже колагених влакана. Мушкарац 33г, кожа врата. Van-Gieson, 100x, камера 4x.



Сл. бр. 80. Повећање простора који припада основној супстанци. Жена 57г, кожа врата. Van-Gieson, 40x, камера 4x.



Сл. бр. 81. Конфлуентна запаљенска жаришта, снопови колагена сведени на узане траке, а простор који припада основној супстанци је повећан. Мушкарац 73г, кожа врата. Van-Gieson, 100x, камера 4x.

Стереолошка студија коже врата показује да је ВГ основне супстанце екстрацелуларног матрикса дерма, најмања у кожи беба ($2.12 \pm 0.12\%$), а највећа у групи најстаријих ($27.31 \pm 3.17\%$). У групи раног животног доба, ВГ основне супстанце екстрацелуларног матрикса дерма, коже врата има просечну вредност $2.68 \pm 0.21\%$, у групи средњег животног доба, просечно $4.19 \pm 0.32\%$, а у групи позног животног доба $19.06 \pm 3.22\%$.

ВГ основне супстанце, екстрацелуларног матрикса дерма коже стомака је најтањи код беба ($2.03 \pm 0.15\%$), расте на ниво од $2.29 \pm 0.18\%$ у кожи раног животног доба и $3.78 \pm 0.26\%$ у кожи особа средњег животног доба. У особа старости од 41 до 60 година има изразито велику вредност од просечно $12.38 \pm 2.12\%$, што се наставља и у групи најстаријих где је вредност $22.81 \pm 2.18\%$ (Табела бр. 8; Графикон бр. 8).

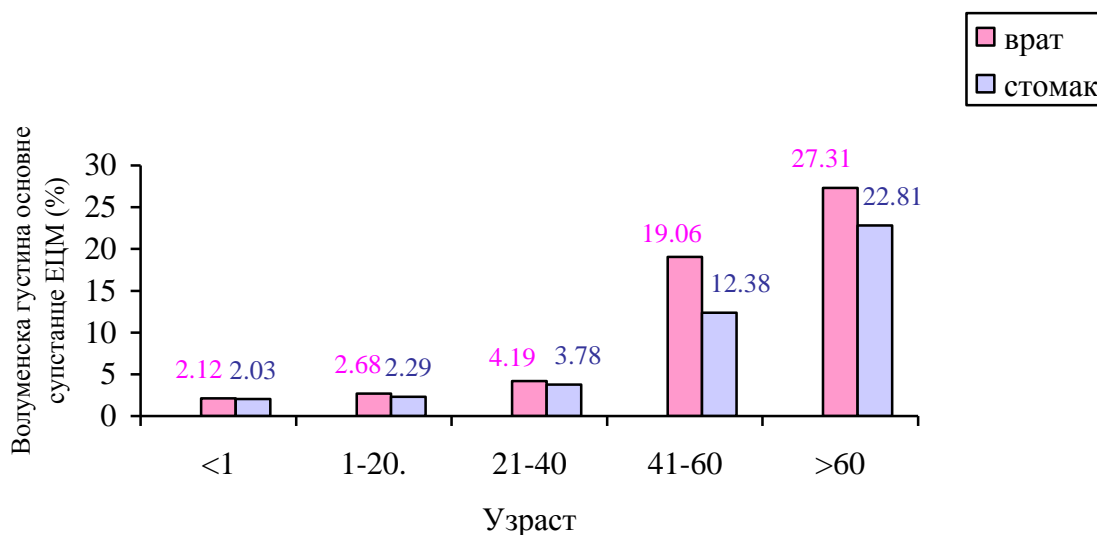
Статистичка анализа показује да не постоји значајна разлика у количини основне супстанце, екстрацелуларног матрикса дерма, између коже врата и стомака новорођене деце. У односу на кожу беба, особе раног животног доба, имају значајно већу количину основне супстанце, екстрацелуларног матрикса дерма, и на кожи врата ($P < 0,001$) и на кожи стомака ($P < 0,01$). У оквиру групе раног животног доба, постоји значајно већа количине основне супстанце, екстрацелуларног матрикса дерма у кожи врата, у односу на кожу стомака ($P < 0,001$). ВГ основне супстанце, екстрацелуларног матрикса дерма, групе средњег животног доба, и на врату ($P < 0,001$) и на стомаку ($P < 0,001$) је значајно већа у односу на групу раног животног доба. Статистичка анализа показује да се у групи средњег животног доба, у кожи врата налази значајно већа количина основне супстанце, у односу на кожу стомака ($P < 0,01$). Група позног животног доба има значајно већу количину основне супстанце, и у кожи врата и у кожи стомака у односу на групу средњег животног доба ($P < 0,001$), а у оквиру саме групе, кожа врата има значајно већу ВГ у односу на кожу стомака ($P < 0,001$). ВГ основне супстанце, екстрацелуларног матрикса дерма коже најстаријих је значајно већа у односу на групу позног животног доба и на врату ($P < 0,01$) и на стомаку ($P < 0,001$), а разлика постоји и између регије врата и стомака у оквиру саме групе најстаријих са већом вредношћу за кожу врата ($P < 0,001$).

Табела бр. 8. Волуменска густина основне супстанце ЕЦМ-а дерма коже испитиваних група

Група	N	Кожа врата (%)		врат vs стомак	Кожа стомака (%)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	2.12	0.12		2.03	0.15
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	2.68 а***	0.21	***	2.29 а**	0.18
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	4.19 б***	0.32	**	3.78 б***	0.26
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	19.06 с ***	3.22	***	12.38 с ***	2.12
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	27.31 д**	3.17	***	22.81 д***	2.18

* - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001

а - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, д- vs позно ж.д.



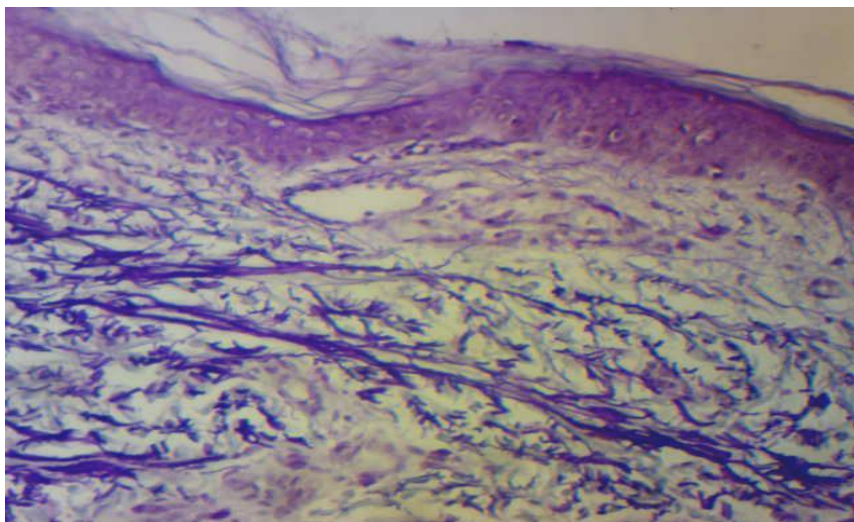
Графикон бр 8. Волуменска густина основне супстанце ЕЦМ-а дерма коже испитиваних група

5.2.4. Општа организација и заступљеност еластичних влакана

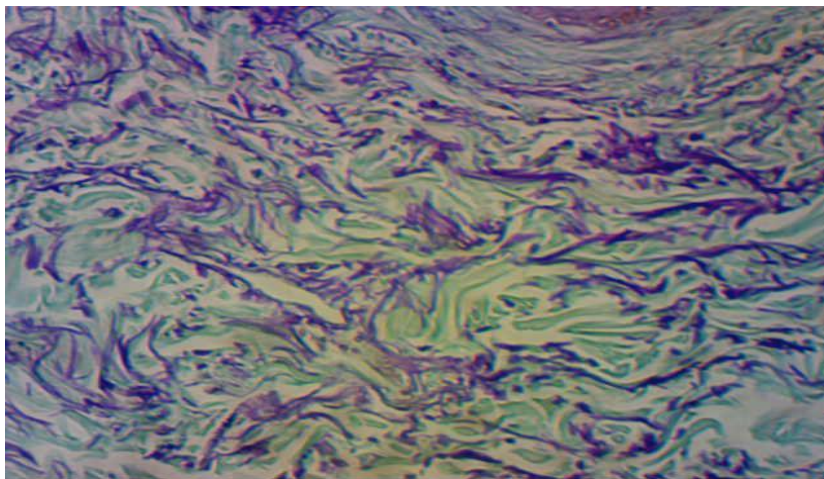
Еластична влакна чине посебну врсту фибриларних протеина са специфичном структуром која је одређена присуством доминантне аморфне компоненте (еластина) и фибрина 1 и 2, гликопротеина који представљају главну компоненту микрофибрила. У нашем истраживању смо за идентификацију еластичних влакана користили хистохемијску методу модификованог *Aldehyd fuchsin* бојења тзв. *Halmi* модификацију методе *Гомори* (Af-H-LG), у којој се користи алдехид фуксин са лајт грином (light green) или наранџастом Г (orange G) као контрабојењем. Овим бојењем колаген и базална мембрана се боје зелено, а мастоцити, еластична влакна, као и пехарасте ћелије (слуз), љубичасто. Коришћењем поливалентне базне боје, алцијан плаво (alcian blue), по методи *Spicera*, којом смо детектовали мастоците, добро се боје и еластична влакна, па смо и овако обојене узорке користили за хистолошку анализу.

При анализи ткивних узорака праћен је начин организације еластичних влакана, њихова густина, дужина, дебљина, вијугавост, односно упоређивана је структура, организација и густина еластичних влакана између група.

У кожи новорођенчади и младих, уочено је да еластична влакна формирају фину мрежу, уређене структуре. Еластична влакна у папиларном дермису су танка, оријентисани у неколико праваца, добре и уједначене пријемчивости за боју. Доминирају влакна која су паралелна површини коже. У ретикуларном дермису, еластична влакна су нешто дебља и дужа, таласаста и распоређена паралелно са површином коже (сл. 82, 83).

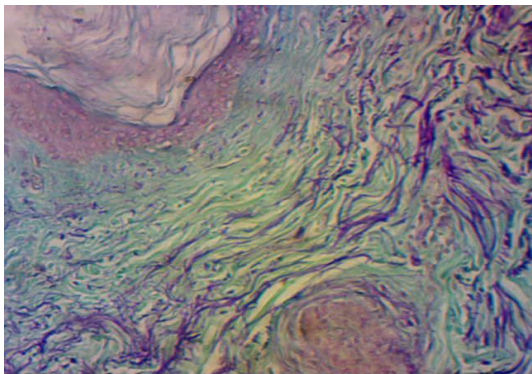


Сл. бр. 82. Фина мрежа еластичних влакана. У ретикуларном дерму су влакна паралелна са површином епидерма. Кожа стомака новорођенчета. Spicer 100X, камера 4x.

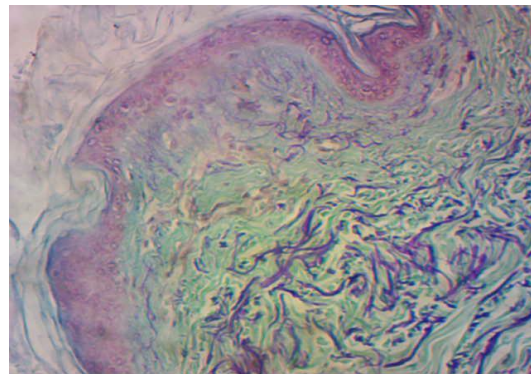


Сл. бр. 83. Дебља еластична влакна, смештена су у доњем делу дермиса и аранжирана су слично сноповима колагених влакна, паралелно са површином коже. Мушкарац, 17г, кожа врата. Spicer 100X, камера 4х.

Кожа средњег животног доба има сличан распоред еластичних влакана као и кожа младих. У папиларном дермису се види фина мрежа изграђена од танких влакана, оријентисаних у неколико праваца, добре и уједначене пријемчивости за боју. У ретикуларном дермису, еластична влакна су дебља, дужа и таласаста, распоређена паралелно са површином коже (сл. 84). Међутим, дискретне промене регистровани смо на 3 узорка коже врата у виду фокалних накупина, промењених еластичних влакана у ретикуларном дерму (сл. 85).



Сл. бр. 84. Благо таласаста еластична влакна се у горњим слојевима дермиса пружају у разним смеровима. Мушкарац, 38г, кожа стомака. Spicer, 40х, камера 4х.



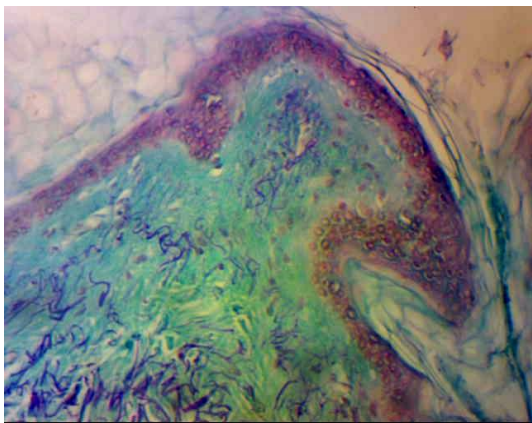
Сл. бр. 85. Дебља еластична влакна у доњим деловима дермиса и танки фибрили који се пружају вертикално у папилама. Мушкарац, 38г, кожа врата. Spicer, 40х, камера 4х.

У групи позног животног доба и групи најстаријих, на фотоекспонираној кожи, постоји тенденција ка фрагментацији еластичних влакана, како на нивоу папиларног, тако и на нивоу ретикуларног дермиса. Код особа позног животног доба, папиларни дермис губи фину мрежу еластичних влакана, која се постепено проређује. Појављују

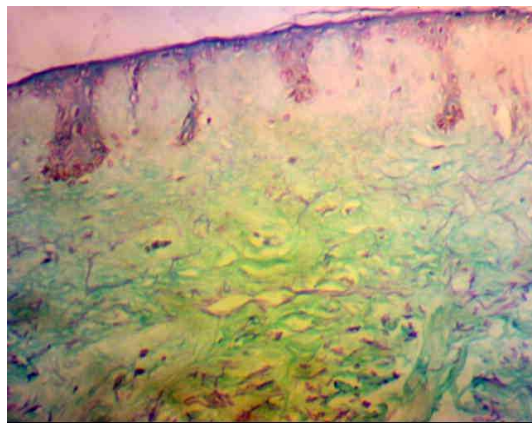
се фрагментована влакна, смањеног афинитета за боје, чак и квантитативно мањег обима (сл. 86, 87, 88, 89). Промене се јављају у ретикуларном дермису где еластична влакна имају тенденцију ка постепеном згушњавању (сл. 86), а истовремено се евидентира и процес еластолизе. Еластолиза је на почетку дискретна, али са старењем прогредира, тако да је видљива у готово свим узорцима најстаријих. Фрагментација еластичних влакана је израженија у групи најстаријих (сл. 90, 91, 93) мада се на неким узорцима виде и релативно издужена влакна. Истовремено, постоји и израженије задебљање еластичних влакана и то обе групе: и фрагментованих и оних који задржавају одређену фибриларну структуру. Фрагментација изгледа захвата готово сва влакна, тако да у групи старих узорци коже садрже фрагментована влакна са сниженим афинитетом за боје (сл. 92, 94, 96). Ово може значити да ова влакна поред фрагментације трпе и неке структурне модификације и губе своју класичну структуру.

При фотостарењу јављају се акумулације измењених еластичних влакана који заузимају различите делове дерма, а најчешће је то на граници папиларног и ретикуларног дерма. У препаратима коже са регије врата особа, средњег животног доба знаке почетне соларне еластоze смо уочили код 3 узорка. У групи позног животног доба, знаке соларне еластоze, различите форме, је имало 12 узорака, а у групи најстаријих, код 14 узорака истраживане коже смо уочили неке елементе умерене и изражене еластоze (сл. 92, 94, 95, 96, 97).

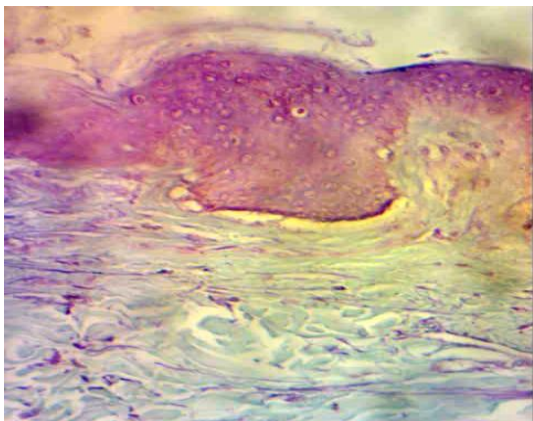
У фотонеекспонираној кожи групе позног и најстаријег животног доба, промене су далеко суптилније, него на фотекспонираној кожи. Запажа се општа редукција и фрагментација еластичних влакана у папиларном и ретикуларном дерму. Нема накупина дебелих, испреплетаних влакана које представљају еластозни материјал (сл. 98, 99).



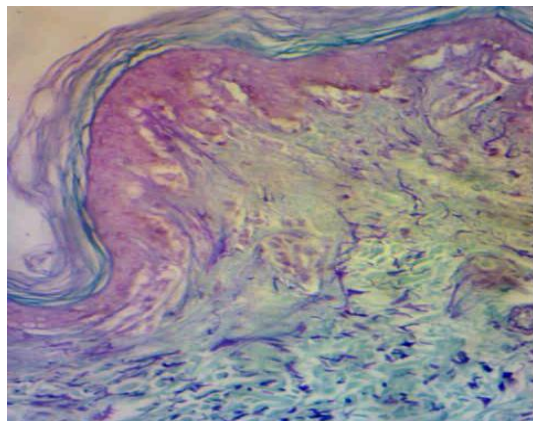
Сл. бр. 86. Фокалне накупине еластичних влакана. Мушкарац, 58г, кожа врата. Spicer 40х, камера 4х.



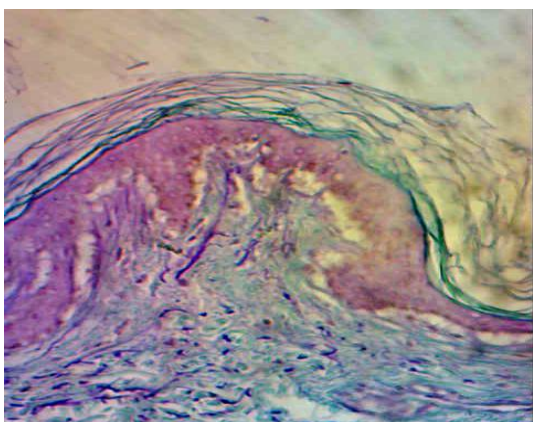
Сл. бр. 87. Јако проређена влакна и у папиларном и у ретикуларном дерму. Мушкарац, 69г, кожа врата. Spicer 40х, камера 4х.



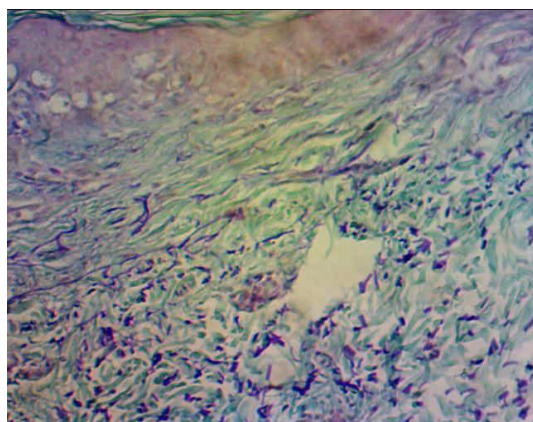
Сл. бр. 88. Потпуно ишчезла еластична влакна и из папиларног и из ретикуларног дерма. Жена, 68г, кожа врата. Spicer 40х, камера 4х.



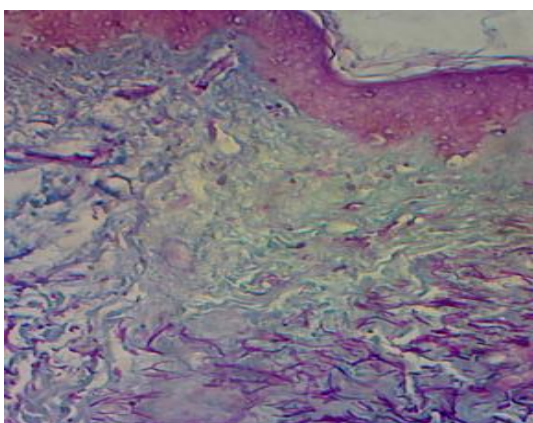
Сл. бр. 89. Груба, фрагментисана, местимично зрнасто-бројчанита влакна у ретикуларном дерму. Мушкарац, 67г, кожа врата. Spicer 40х, камера 4х.



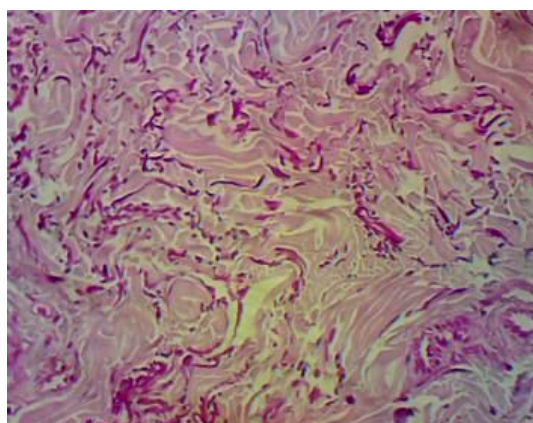
Сл. бр. 90. Покидана мрежа и јако проређена влакна и у папиларном и у ретикуларном дерму. Жена, 58г, кожа врата. Spicer 40х, камера 4х.



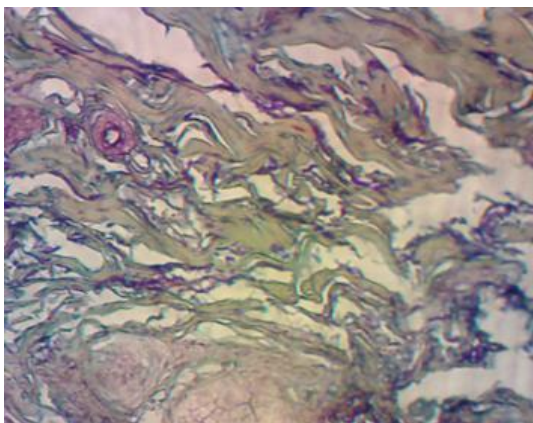
Сл. бр. 91. Нека од еластичних влакана су задебљала у свом средишњем делу. Делимична грануларна дегенерација еластичних влакана у ретикуларном дерму. Жена, 76г, кожа врата. Spicer 40х, камера 4х.



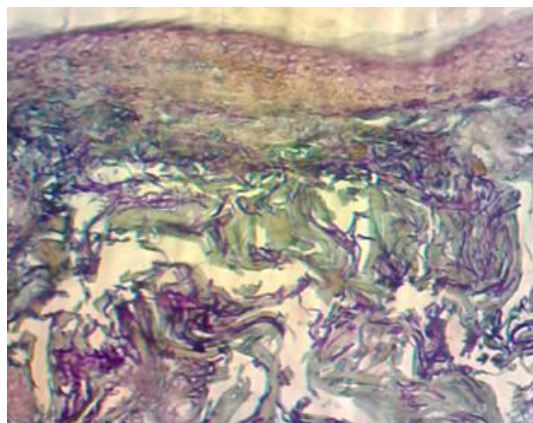
Сл. бр. 92. Потпуно лизирана влакна у највећем делу дерма. Мушкарац, 81г, кожа врата. Aldehyd fuchsin, 40х, камера 4х.



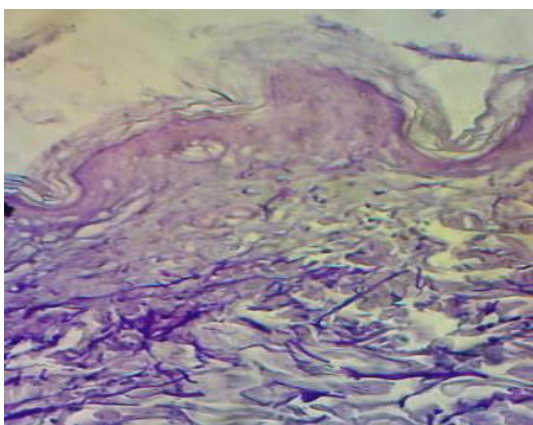
Сл. бр. 93. Груба, фрагментисана и фокално дегенерисана влакна у ретикуларном дерму. Жена, 78г, кожа врата. Aldehyd fuchsin 40х, камера 4х.



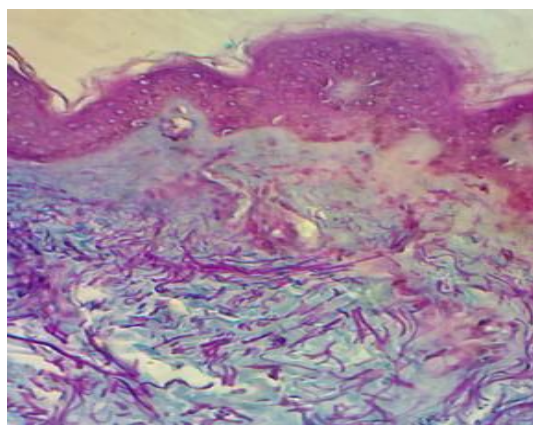
Сл. бр. 94. Набрекла еластична влакна са знацима дегенерације. Жена, 80г, кожа врата. Af-H-LG 400X, камера 4х.



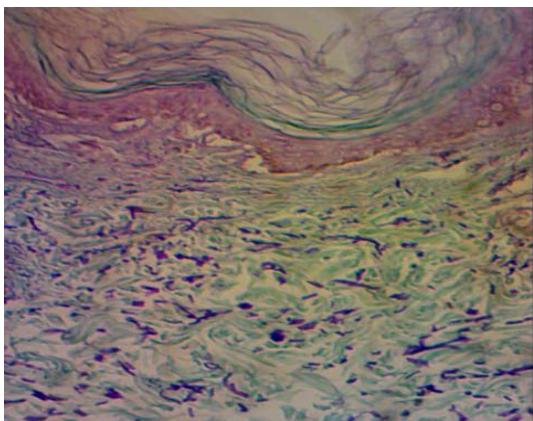
Сл. бр. 95. Акумулације измењених еластичних влакана у ретикуларном дерму. Соларна еластоza. Мушкарац, 81г, кожа врата. Af-H-LG 40х, камера 4х.



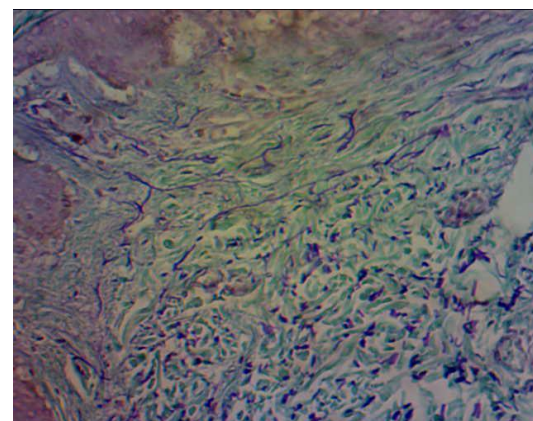
Сл. бр. 96. Набрекла еластична влакна са знацима дегенерације, као што су фрагментација и збијеност. Жена, 77г, кожа врата. Af-H-LG 40х, камера.



Сл. бр. 97. Накупине промењених еластичних влакана. Соларна еластоza. Мушкарац, 77г, кожа врата. Spicer 40х, камера 4х.



Сл. бр. 98. Редукована мрежа еластичних влакана. Жена, 58г, кожа стомака. Af-H-LG, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 99. Редукција еластичних влакана. Фрагментација влакана у ретикуларном дермису. Жена, 69г, кожа стомака. Af-H-LG, 40х, камера 4х.

Стереолошким истраживањем и статистичком обрадом података нађено је да средња вредност волуменске густине (ВГ) еластичне мреже у кожи врата

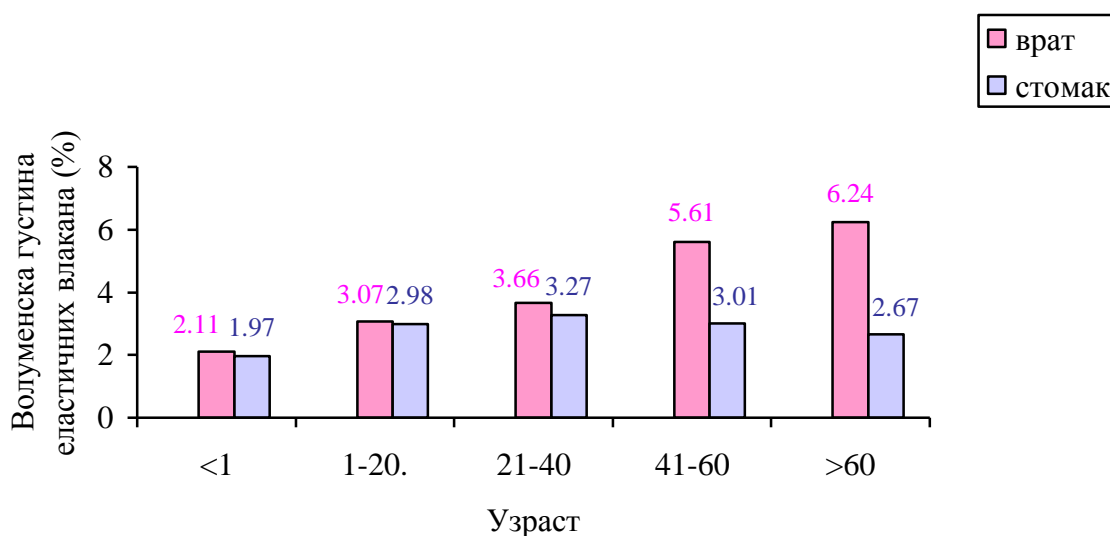
новорођенчади износи $2.11 \pm 0.18\%$, а у кожи стомака $1.97 \pm 0.11\%$ и да та разлика није статистички сигнификантна (табела бр. 9; графикон бр. 9). Код групе раног животног доба, ВГ еластичне мреже коже врата износи $3.07 \pm 0.21\%$ и значајно је већа у односу на кожу врата новорођене деце ($P < 0,001$). Кожа стомака групе раног животног доба, има већу вредност ($2.98 \pm 0.16\%$) у односу на кожу стомака новорођенчади ($P < 0,01$), а у оквиру саме групе разлика ВГ еластичне мреже, коже врата и коже стомака, није статистички значајна. ВГ еластичне мреже, у кожи врата групе средњег животног доба, има вредност $3.66 \pm 0.28\%$ и значајно је већа у односу на кожу раног животног доба ($P < 0,001$), а та разлика се евидентира и на кожи стомака за ($P < 0,05$). У самој групи постоји статистичка значајност разлике ВГ еластичних влакана између коже врата и стомака и та вредност је већа на кожи врата ($P < 0,001$). Вредност ВГ еластичне мреже коже врата у позном животног добу је значајно виша него у кожи врата средњег животног доба ($P < 0,001$). Такође је вредност ВГ еластичне мреже коже стомака ове групе, значајно нижа него у кожи стомака ($P < 0,05$) средњег животног доба, а и у оквиру саме групе су значајно веће на кожи врата ($P < 0,001$). Кожа најстаријих има значајно веће вредности ВГ на регији врата у односу на кожу позног животног доба ($P < 0,01$). ВГ коже стомака ове групе има статистички значајно мању вредност него у групи позног животног доба ($P < 0,001$) а евидентира се и значајно већа вредност ВГ у оквиру саме групе у кожи врата ($P < 0,001$).

Табела бр. 9. Волуменска густина еластичних влакана у кожи испитиваних група

Група	N	Кожа врата (%)		врат vs стомак	Кожа стомака (%)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	2.11	0.18		1.97	0.11
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	3.07 a***	0.21		2.98 a**	0.16
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	3.66 б***	0.28	***	3.27 б*	0.24
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	5.61 c***	0.22	***	3.01 c*	0.18
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	6.24 d**	0.21	***	2.67 d***	0.10

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$

a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон бр. 9. Волуменска густина еластичних влакана у кожи испитиваних група

5.2.5. Дистрибуција и квантификација мастоцита

У нашем истраживању детекција мастоцита вршена је употребом више хистохемијских метода бојења: поливалентне базне боје алцијан плаво (*Alcian blue*), по методи *Spicera*, којом се приказују кисели мукополисахариди и гликозаминогликани и која је погодна за идентификацију мастоцита, јер боји плаво до љубичасто метахроматске грануле, присутне у цитоплазми мастоцита. Мастоцити су детектовани и *Giemsa* методом, као и *Toluidin blue* техником бојења. Морфолошки, мастоцити су округле, овалне или издужене ћелије са централно постављеним округлим једром, обилне цитоплазме у потпуности испуњене гранулама које прелазе преко једра, а *Giemsa* бојењем и *Toluidin blue* (ТБ) техником се боје метахроматски. Такође смо, за идентификацију мастоцита, посебно у кожи фетуса и новорођенчади, користили кисели *Aldehyd fuchsin*, којим се цитоплазма мастоцита боји плавољубичасто.

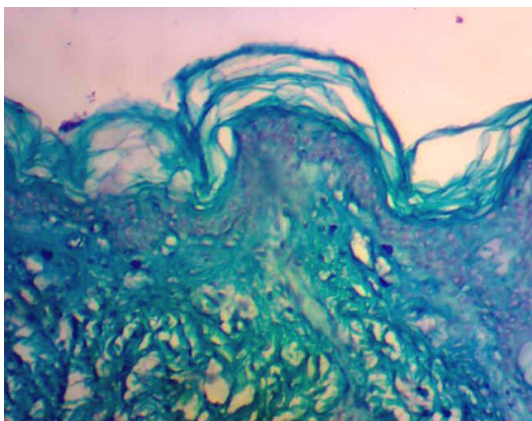
Кожа фетуса и новорођенчади садржи умерен број мастоцита, распоређених по целом дермису, са нешто већим присуством у папиларном слоју. Мастоцити коже новорођенчади су углавном регистровани у близини капилара, а по морфолошким особинама то су углавном округле и овалне ћелије, комплетно испуњене гранулама (сл. 100, 101).

На препаратима младе коже запажа се велики број мастоцита, округлог, овалног или дугуљастог облика, најчешће у близини капиlara. Има се утисак да су распоређени по целом дерму, али преобладајуће уз крвне судове. Будући да је највећи број капиlara присутан у близини длачних фоликула, себацеалних и знојних жлезда, већина мастоцита се налази управо у тим подручјима (сл. 102, 103, 104). Известан проценат ћелија делимично је дегранулисана, док се код већине запажа да је читава цитопlasма испуњена гранулама. Генерално се може рећи да мастоцита има више у ретикуларном него у папиларном слоју дерма, а највише их има на граници између ова два слоја (сл. 103, 104). Готово да нема разлике између фотоекспониране и фотонеекспониране коже.

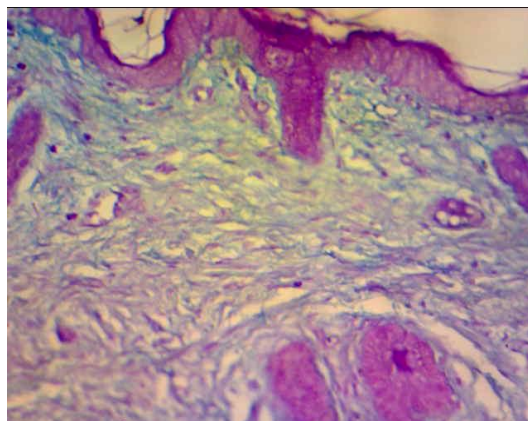
На препаратима фотонеекспониране коже група средњег и позног животног доба запажа се повећан број мастоцита у ретикуларном слоју дерма, са тенденцијом груписања око артеријских и венских крвних судова, док их између колагених снопова има најмање и тада су обично дугуљастог облика. Број мастоцита у дермним папилама је умерен, а ни у једном узорку ове ћелије нису запажене унутар епитела (сл. 105, 106).

На препаратима фотоекспониране коже група средњег и позног животног доба, региструје се значајно већи број мастоцита, у односу на препарате фотонеекспониране коже са доста дегранулисаних ћелија (сл. 107, 108, 109). Запажа се да је концентрација мастоцита повећана у близини накупина еластичних влакана, као и у запаљењским инфилтратима, ако су присутни (сл. 107, 109). Мастоцити се могу видети и између слеплених колагених снопова, где најчешће имају издужени облик (сл. 111). Приметно је да их највише има управо у регијама дерма који садржи еластозни материјал, као и око већих крвних судова (сл. 112). Иако се налазе у близини еластозно измењеног материјала добија се утисак да су примарно на оним местима где колагена влакна подлежу процесу колагенолизе. На тим местима се могу видети накупине крупних, округлих ћелија добро испуњених метахроматским гранулама (сл. 108, 109).

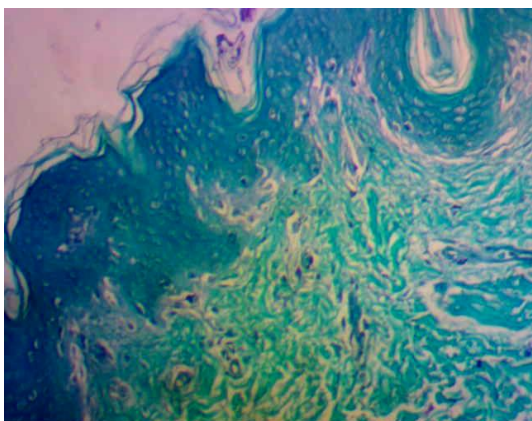
У групи најстаријих и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи приметан је мањи број мастоцита. Мастоцити су готово равномерно распоређени по целом дерму без посебног афинитета за неку регионалну одредницу. Има се утисак, да са смањењем васкуларне мреже долази и до редукције броја мастоцита. Што се морфологије мастоцита тиче, срећу се најчешће дегранулисане ћелије, издуженог, вретенастог облика (сл. 113, 114, 115).



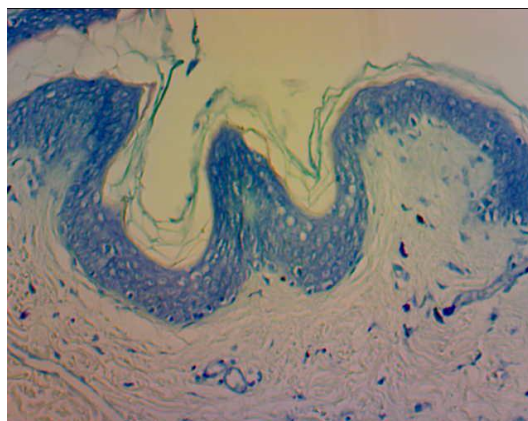
Сл. бр. 100. Мастоцити округлог облика у папиларном дерму новорођенчета. Кисели Aldehyd fuchsin, 40х, камера 4х.



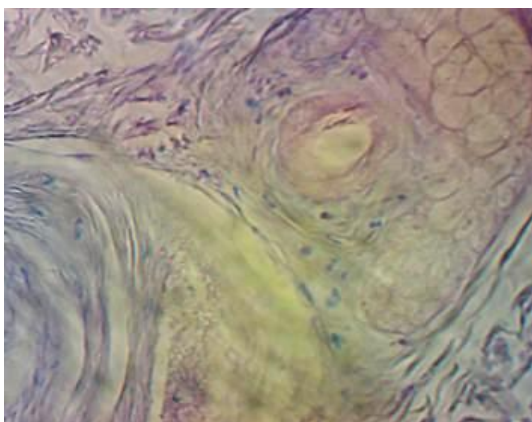
Сл. бр. 101. Снажно присуство мастоцита у целом дерму новорођенчета. Кисели Aldehyd fuchsin, 40х, камера 4х.



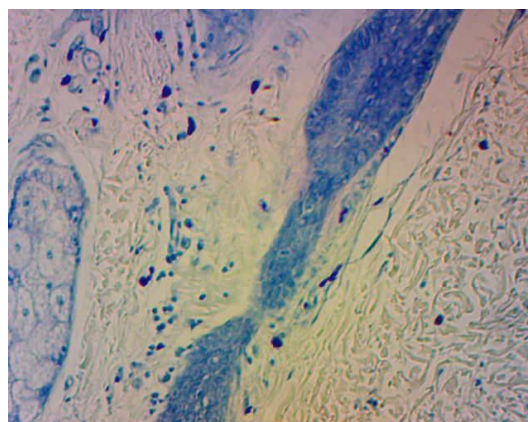
Сл. бр. 102. Бројни мастоцити на самој граници са епидермом и око крвних судова. Дечак, 3г, кожа врата. Кисели Aldehyd fuchsin, 40х, камера 4х.



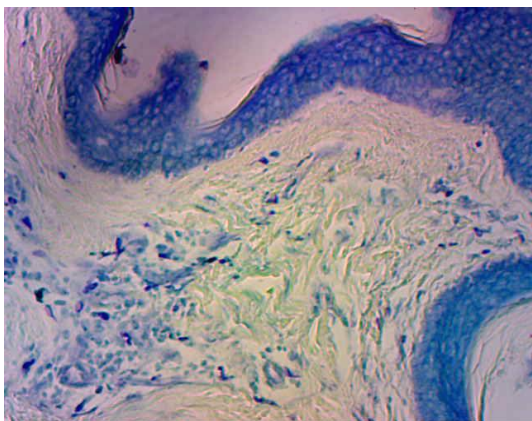
Сл. бр. 103. У папиларном дерму, периваскуларно и између снопова колагена уочава се велики број мастоцита углавном овалног и дугуљастог облика. Младић 16г, кожа врата. Кисели Aldehyd fuchsin, 40х, камера 4х.



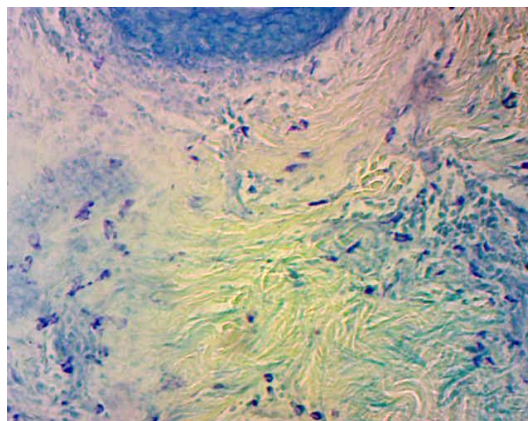
Сл. бр. 104. Мастоцити око фоликула длаке. Младић, 18г, кожа стомака. Кисели Aldehyd fuchsin, 40х, камера 4х.



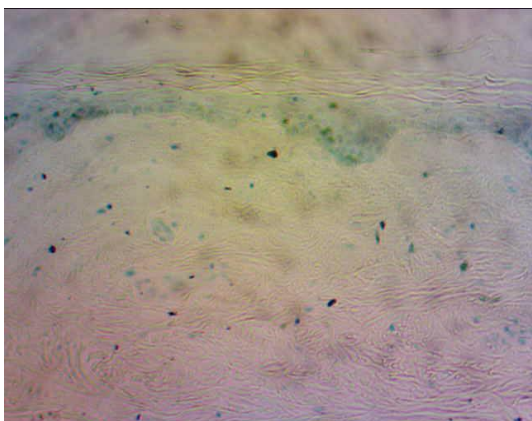
Сл. бр. 105. Мастоцити дугуљастог и вретенастог и округлог облика. Жена, 25г, кожа стомака. Giemsa, 40х, камера 4х.



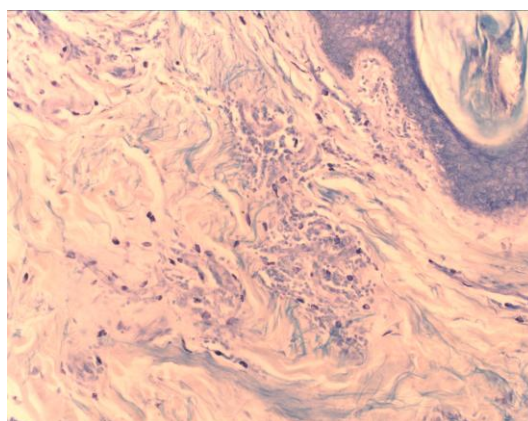
Сл. бр. 106. Мастоцити дугуљастог и вретенастог облика на граници папиларног и ретикуларног дерма, углавном око крвних судова. Мушкарац, 23г, кожа стомака. Giemsa, 40х, камера 4х.



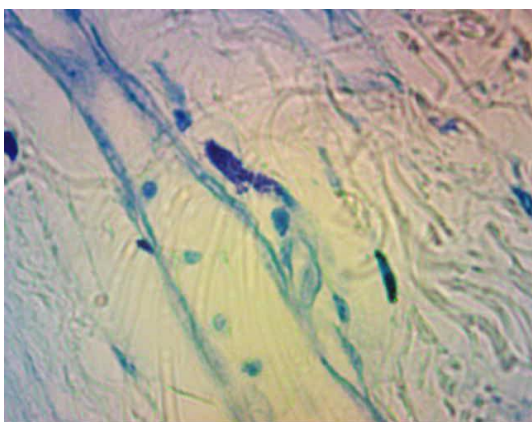
Сл. бр. 107. Повећан број дифузно распоређених мастоцита. Мушкарац, 23г, кожа врата. Giemsa, 40х камера 4х.



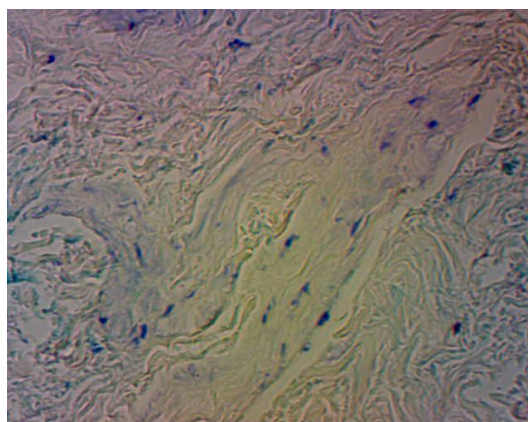
Сл. бр. 108. У иницијалној фази колагенизације повећава се број мастоцита. Мушкарац, 58г, кожа врата. Toluidin blue, 40х, камера 4х.



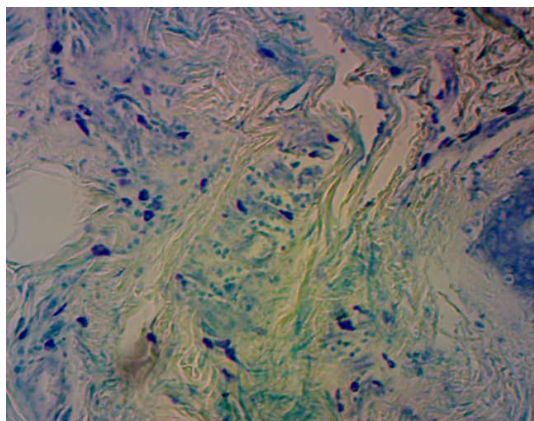
Сл. бр. 109. Мастоцити у запаљенском жаришту и око накупине еластичних влакана. Жена, 43г, кожа врата. Giemsa, 40х, камера 4х.



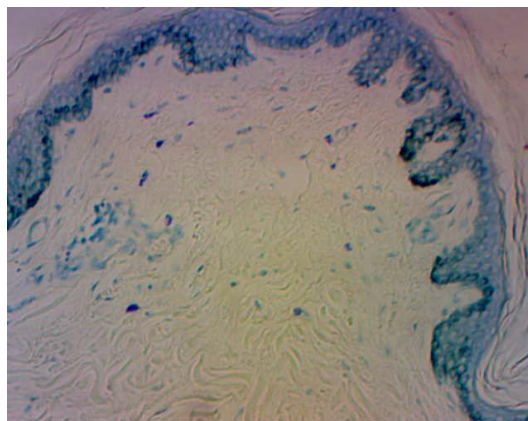
Сл. бр. 110. Дегранулисани мастоцит уз крвни суд. Жена 43г, кожа врата. Giemsa, 400Х камера 4х.



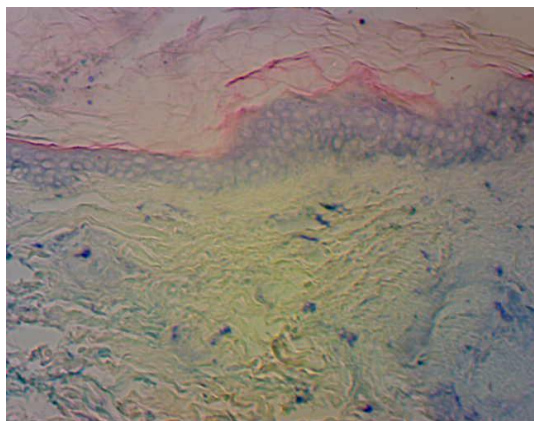
Сл. бр. 111. Мастоцити у слепљеним колагеним влакнима. Жена 67г, кожа врата. Giemsa, 100Х, камера 4х.



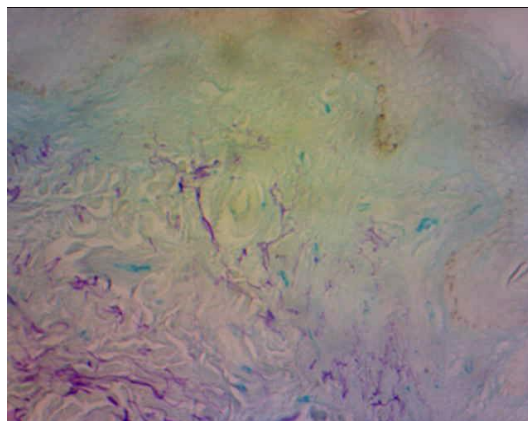
Сл. бр. 112. Мастоцити округлог, овалног и неправилног облика, у великом броју око крвних судова ретикуларног дерма. Жена 50г, кожа врата. Giemsa, 100X, камера 4х.



Сл. бр. 113. Углавном дегранулисани мастоцити уз проређене крвне судове дерма. Жена 67г, кожа врата. Giemsa, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 114. Мастоцити издуженог облика између остатака колагене мреже у дерму. Мушкарац, 77г, кожа врата. Giemsa, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 115. Мастоцити обојени светлоплаво, између остатака еластичних влакана. Жена 72г, кожа врата. Spicer, 40х, камера 4х.

Квантификацијом у програму *ImageJ* је установљено да везиво дерма коже врата новорођене деце садржи просечно 28.74 ± 12.92 мастоцита/ mm^2 , да кожа врата особа раног животног доба, има 62.18 ± 13.48 мастоцита/ mm^2 , а кожа врата особа средњег животног доба 85.61 ± 24.12 мастоцита/ mm^2 . Група особа позног животног доба имају просечно 109.21 ± 28.15 мастоцита/ mm^2 на кожи врата, док је у групи најстаријих тај број 59.21 ± 26.06 мастоцита/ mm^2 . Кожа стомака новорођене деце има просечно $26,31 \pm 12.64/\text{mm}^2$, а кожа особа раног животног доба $60.48 \pm 12.01/\text{mm}^2$. Просечан број мастоцита у групи средњег животног доба је 68.12 ± 23.59 ћелија/ mm^2 , а групи особа старост од 41 до 60 година 83.76 ± 28.89 ћелија/ mm^2 . Најстарији на кожи стомака имају просечно 42.28 ± 25.72 ћелија/ mm^2 (Табела бр. 10; Графикон бр. 10).

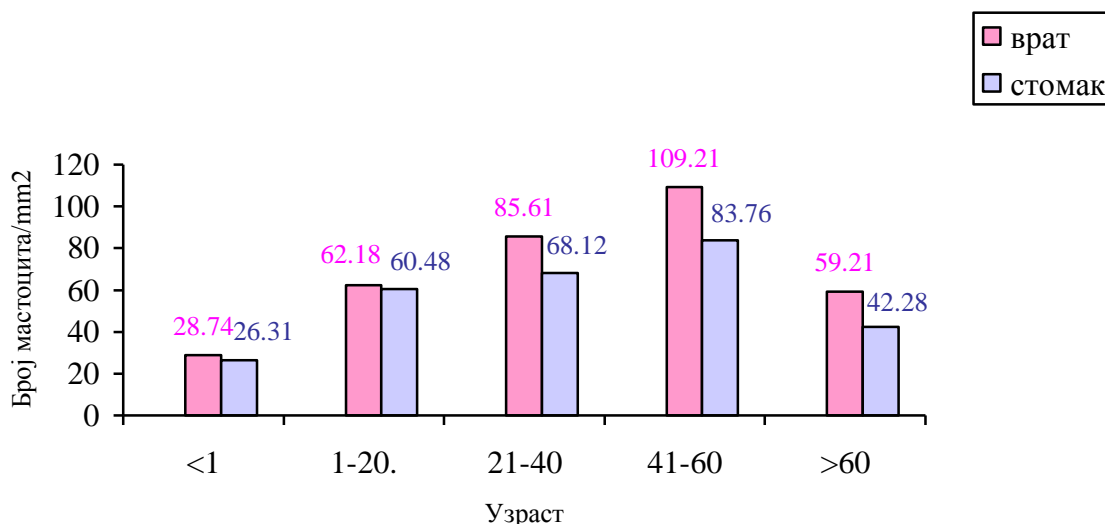
Статистичком анализом је утврђено да је средњи број мастоцита у групи особа раног животног доба значајно већи у односу на кожу врата и кожу стомака новорођене деце ($P<0,001$; $P<0,001$), док разлика у просечном броју мастоцита између коже врата и коже стомака у групи новорођенчади није статистички значајна. Већи средњи број мастоцита у кожи врата, у односу на групу раног животног доба има група средњег животног доба ($P<0,01$), док разлика у просечном броју мастоцита између коже врата и коже стомака у групи раног животног доба није статистички значајна. Група позног животног доба, на кожи врата има значајно већи број мастоцита у односу на групу средњег животног доба ($P<0,01$), док разлика у просечном броју мастоцита на кожи стомака између ове две групе није статистички значајна. У односу на регионалну дистрибуцију у групи средњег животног доба, већи број мастоцита има кожа стомака ($P<0,05$). Група позног животног доба, на кожи врата има значајно већи број мастоцита у односу на кожу стомака ($P<0,01$). Кожа стомака, групе позног животног доба има значајно већи број мастоцита у односу на кожу врата групе раног животног доба ($P<0,01$). Статистички значајно мањи просечан број мастоцита се региструје у кожи врата и стомака најстаријих, у односу на групу позног животног доба ($P<0,001$). Кожа врата у групи најстаријих има значајно већи број мастоцита у односу на кожу стомака ($P<0,05$).

Табела бр. 10. Број мастоцита по mm^2 дерма коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата		врат vs стомак	Кожа стомака	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	28.74	12.92		26.31	12.64
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	62.18 a***	13.48		60.48 a***	12.01
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	85.61 b**	24.12	*	68.12	23.59
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	109.21 c**	28.15	**	83.76 b**	28.89
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	59.21 d***	26.06	*	42.28 d***	25.72

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

a - vs новорођенчад, b - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон бр.10. Број мастоцита по mm^2 дерма коже у испитиваним групама

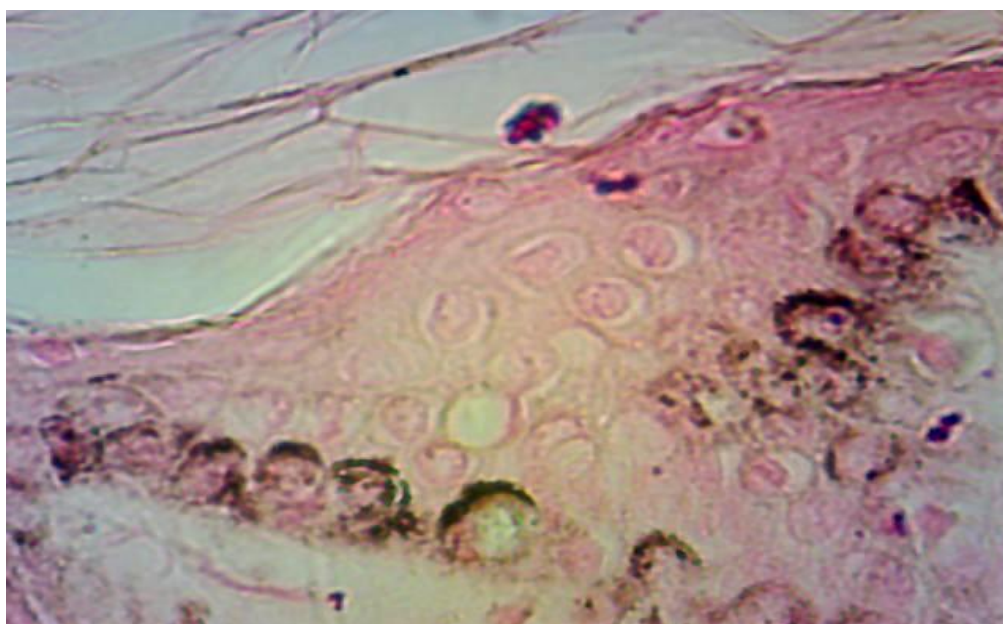
5.2.6. Дистрибуција и квантификација меланина

За детекцију меланина, у нашем истраживању користили смо хистохемијску методу бојења *Masson-Fontana*. У основи методе је аргентафина реакција која пигмент меланин боји црно, а једра црвено. Црно обојене зоне пигмента меланина се у епидермису налазе у меланоцитима и кератиноцитима, а у дерму у дермним меланофагима. Меланоцити који се налазе у базалном слоју епидермиса најчешће садрже велику концентрацију меланина у својој цитоплазми. Међутим, и у кератиноцитима нижих слојева епидермиса, где меланин формира капе изнад једара, такође се налази у великим концентрацијама.

У кожи раног животног доба и на врату и на стомаку, као и кожи средњег животног доба, која је заштићена од сунца, меланин се у малој концентрацији локализује у кератиноцитима базалног слоја епидермиса. У дерму тог животног доба се детектује мали број меланофага (сл. 116).



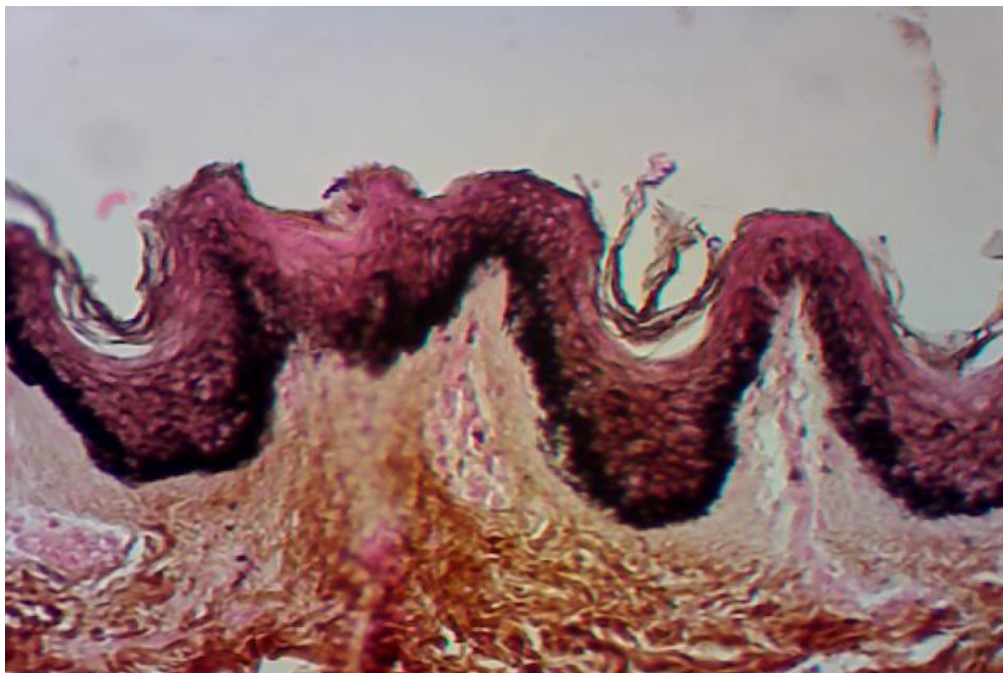
Сл. бр. 116. Црно обојене зоне пигмента меланина се у епидермису налазе у меланоцитима и кератиноцитима, а у дерму у дермалним меланофагима. Дечак, 3г, кожа врата. Masson Fontana, 40х, камера 4х.



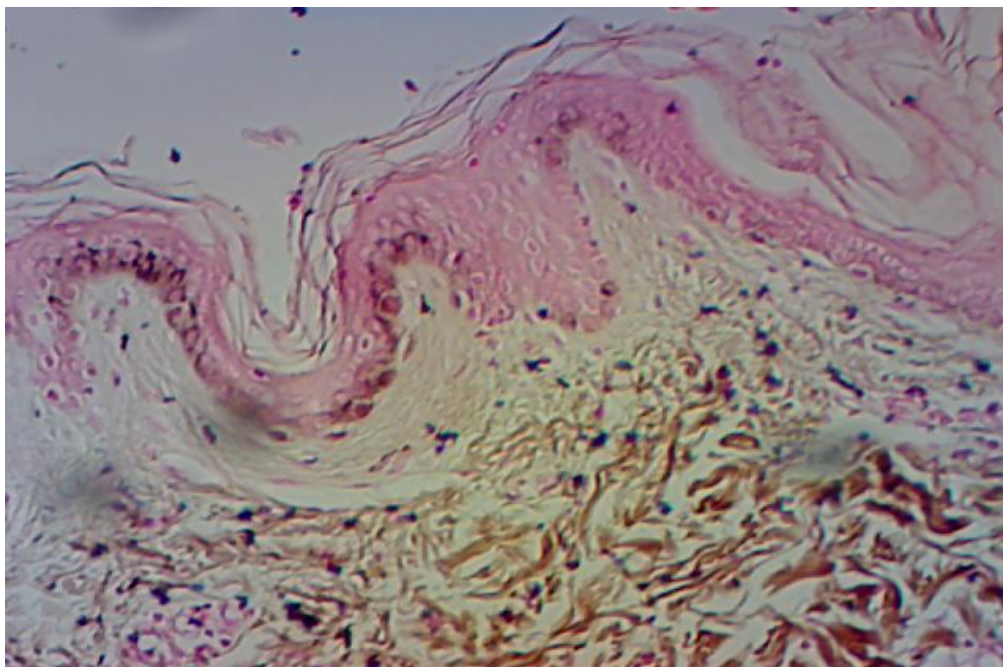
Сл. бр. 117. Супрануклеусне капе у кератиноцитима. Дечак, 3г, кожа врата. Masson Fontana, 400X, камера 4х.

На једном узорку смо регистровали неуобичајено високу концентрацију меланина у епидермису која је готово у потпуности брисала контуре ћелија у

базалном слоју епидермиса. Реч је о кожи која припада типу IV по Fitzpatrick-у (сл. 118). Сви остали узорци су тип II и III, који су уобичајени типови нашег поднебља.

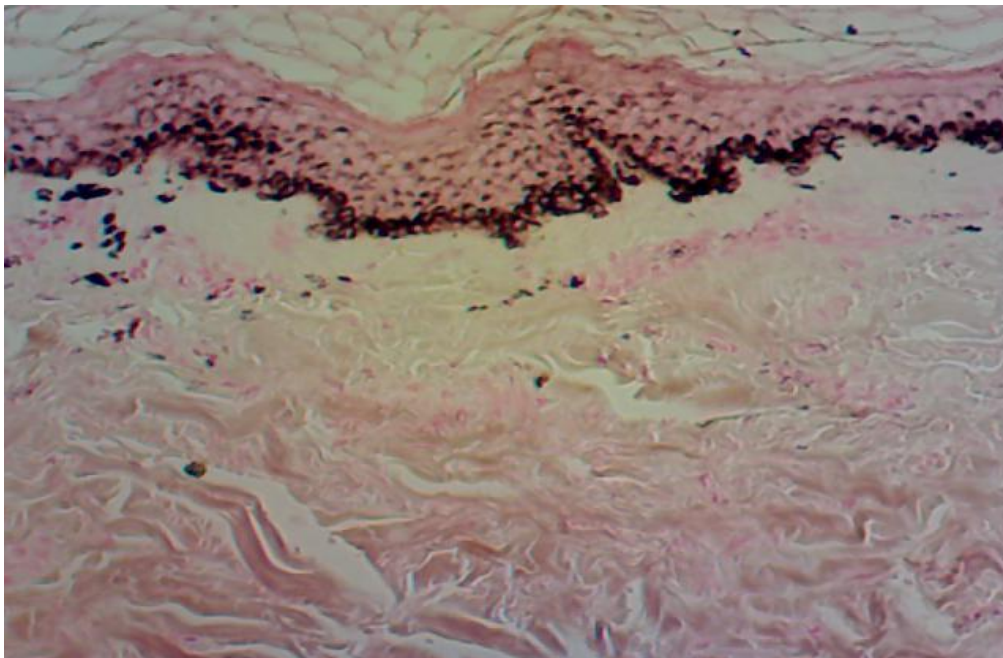


Сл. бр. 118. Изузетно висока концентрација меланина у епидермису. Дечак, 8г, кожа врата, тип IV (дете ромске националности). Masson Fontana, 40х, камера 4х.

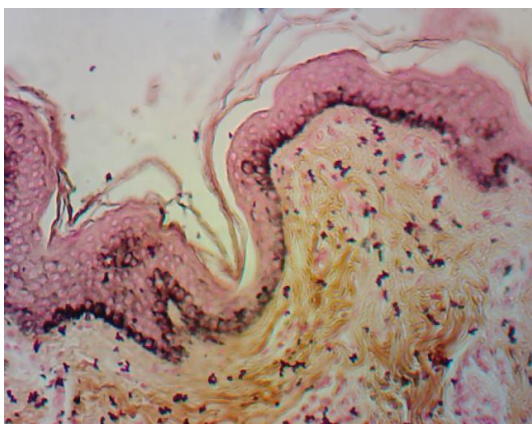


Сл. бр. 119. Мала концентрација пигмента меланина у епидермису. У неким зонама га уопште и нема. Нешто већи број дермалних меланофага. Младић, 16г, кожа врата. Masson Fontana, 40х, камера 4х.

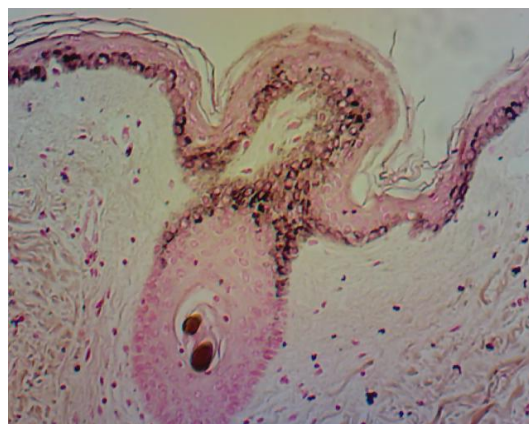
У кожи која је стално изложена Сунцу, групе средњег и позног животног доба, пигмент меланин се налази у високој концентрацији, како у базалном тако и у вишим слојевима епидермиса- спинозном и гранулозном слоју (сл. 120, 121, 122). Запажа се да је број меланинских капа више присутан него код коже младих, као и коже која је заштићена од сунца ових група.



Сл. бр. 120. Меланин у високој концентрацији у базалном слоју епидермиса, али се меланинске капе виде и у вишим слојевима. Мушкарац, 37г, кожа врата Masson Fontana, 40х, камера 4х.



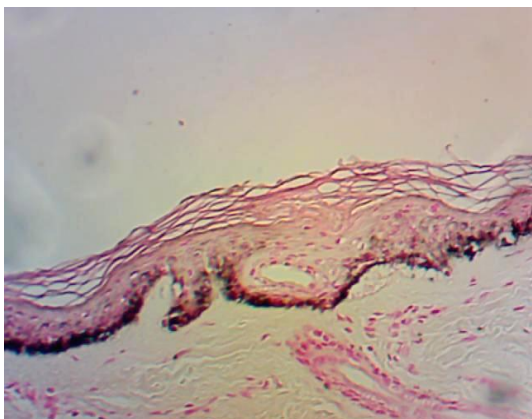
Сл. бр. 121. Меланин равномерно распоређен у базалном слоју епидерма. Мушкарац, 52г, кожа врата Masson Fontana, 40х, камера 4х.



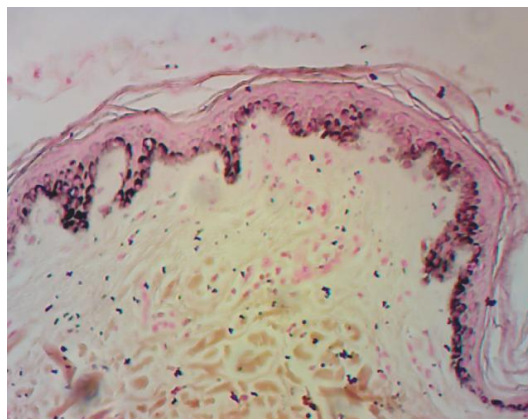
Сл. бр. 122. Меланин у атрофичном епитељу и око длачног фоликула. Мушкарац, 59г, кожа врата Masson Fontana, 40х, камера 4х.

У групи најстаријег животног доба уочава се да је концентрација меланина већа у кожи врата у односу на кожу стомака. Као и у групи позног животног доба,

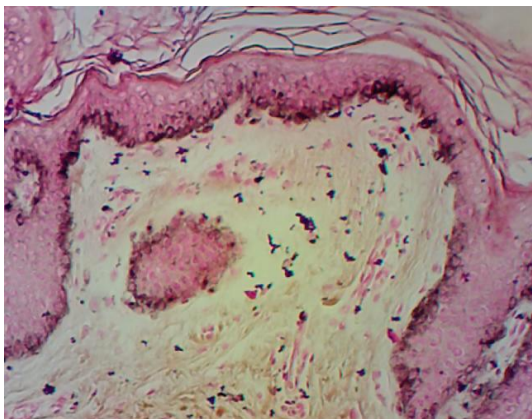
меланин је распоређен у базалном слоју, а на неким узорцима и спинозном слоју епидермиса. Вероватно да у зависности од количине и дужине инсолације, долази и до различите заступљености меланина у епидермису. Има узорака са доста великом концентрацијом пигмента (сл. 123, 124, 125) али и са изузетно ниском концентрацијом меланина (сл. 126, 127), која је на неким узорцима слична концентрацији, каква се виђа на фотозаштићеној кожи стомака (сл. 128).



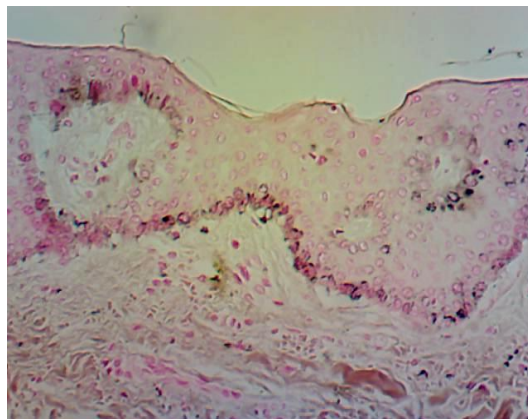
Сл. бр. 123. Велика количина меланина у базалном слоју епидерма. Мушкарац 65г, кожа врата. Masson Fontana, 40х, камера 4х.



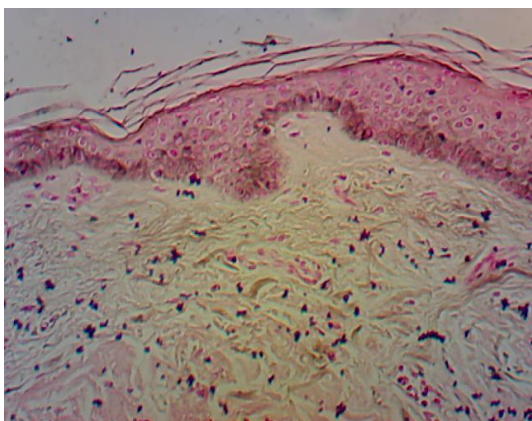
Сл. бр. 124. Меланин у кератиноцитима углавном базалног слоја епидерма. У дерму бројни меланофаги. Жена 67г, кожа врата. Masson Fontana, 40х, камера 4х.



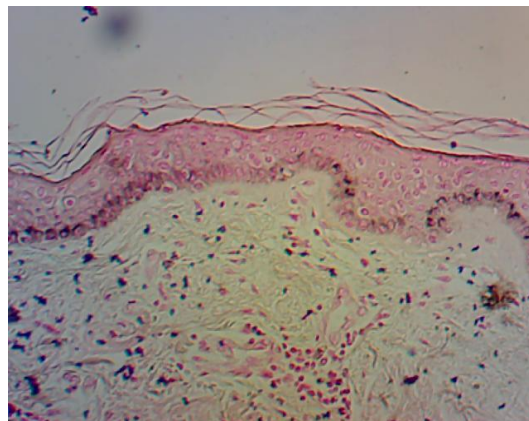
Сл. бр. 125. Меланин у већој концентрацији у базалном слоју епидерма. Жена 75г, кожа врата. Masson Fontana, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 126. Мала концентрација меланина у базалном слоју епидермиса. Жена 80г, кожа врата. Masson Fontana, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 127. Мала концентрација меланина у базалном слоју епидермиса. Жена 78г, кожа врата. Masson Fontana, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 128. Фокалне накупине меланина, ниске концентрације у базалном слоју епидермиса. Жена 78г, кожа стомака. Masson Fontana, 40х, камера 4х.

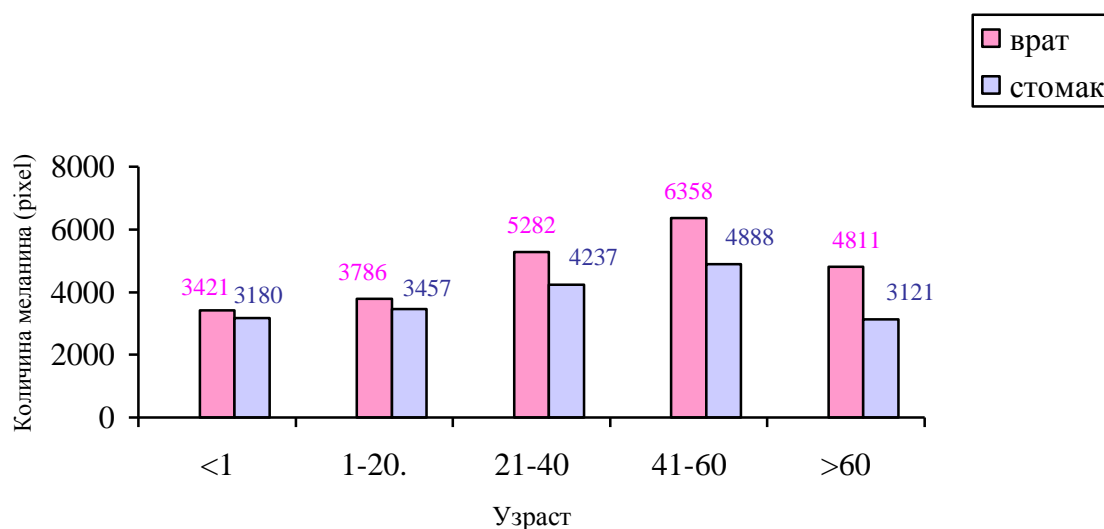
Мерењем у програму *Image J*, утврђено је да средња вредност интензитета меланина у пикселима (pixel) у кожи врата новорођенчади износи 3421.12 ± 856.67 pixel-а, а у кожи стомака 3180.62 ± 798.34 pixel-а и да та разлика није статистички сигнификантна (табела бр. 11; графикон бр. 11). Код групе раног животног доба интензитет меланина у кожи врата износи 3786.16 ± 998.53 pixel-а и значајно се не разликује у односу на кожу врата новорођене деце. Кожа стомака раног животног доба има већу вредност (3457.71 ± 668.13 pixel-а) у односу на кожу стомака новорођенчади, али разлика није статистички значајна. У оквиру саме групе раног животног доба, разлика интензитета меланина, коже врата и коже стомака, није статистички значајна. Меланин у групи средњег животног доба статистички је значајно већи и у односу на кожу врата ($P < 0,01$), и кожу стомака ($P < 0,05$) групе раног животног доба, а и унутар саме групе средњег животног доба евидентира се разлика у односу на регију коже (врат-стомак) са већом вредношћу на врату ($P < 0,05$). Група позног животног доба има статистички значајно већи интензитет меланина у кожи врата у односу на кожу стомака ($P < 0,01$), док у односу на средње животно доба (врат и стомак) нема статистички значајне разлике. У кожи најстаријих је интензитет меланина значајно већи на кожи врата у односу на кожу стомака ($P < 0,001$), а интензитет меланина у односу на групу позног животног доба значајно је мањи и на кожи врата ($P < 0,01$), и на кожи стомака ($P < 0,001$).

Табела бр. 11. Количина меланина у епителу коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (pixeli)		врат vs стомак	Кожа стомака (pixeli)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	3421	856.67		3180	798.34
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	3786	998.53		3457	668.13
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	5282 б**	1286.11	*	4237 б*	1186.29
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	6358	1576.46	**	4888	1062.12
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	4811 д**	1234.12	***	3121 д***	1069.54

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$

а - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, д- vs позно ж.д.



Графикон бр. 11. Количина меланина у епителу коже у испитиваним групама

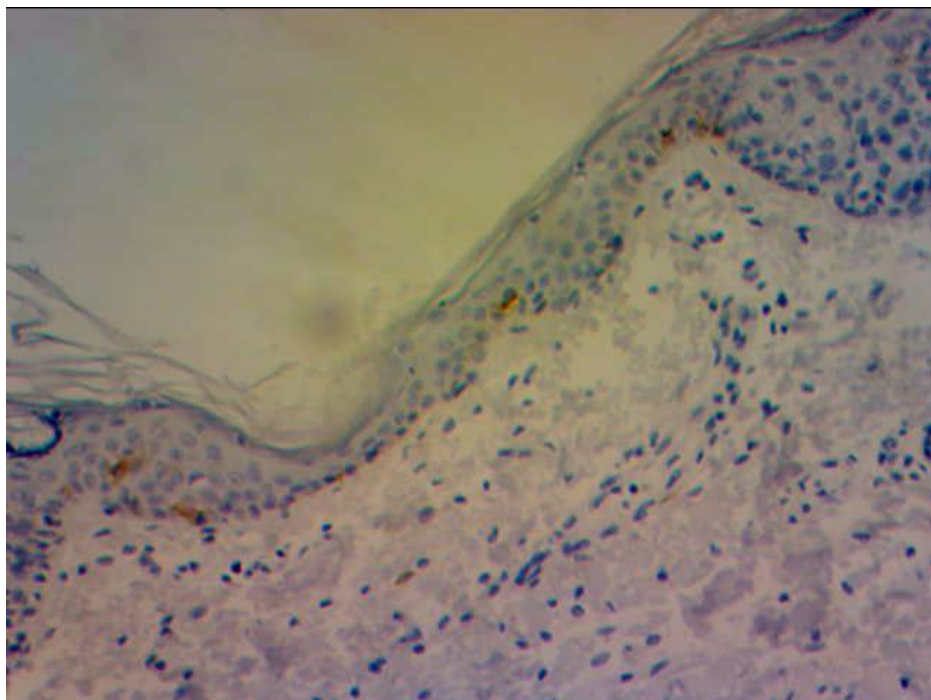
5.3. Имунохистохемијска анализа фотоекспониране и фотонеекспониране коже

5.3.1. Дистрибуција и квантификација антиген-презентујућих ћелија

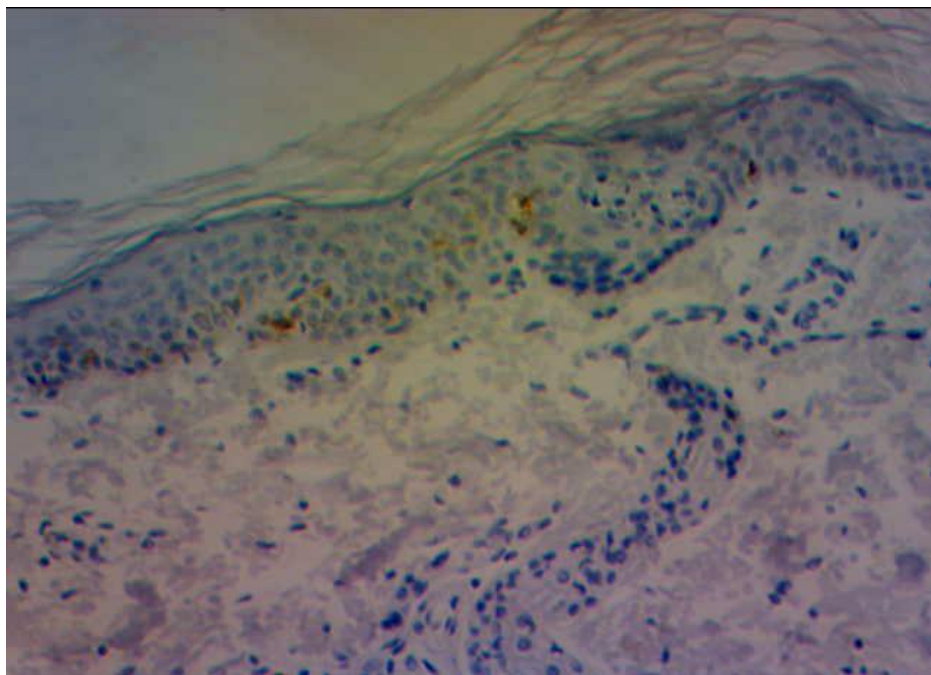
Идентификација антиген-презентујућих ћелија вршена је преко маркера CD1a и S-100 протеина. CD1a је коришћен као маркер за незреле дендритичне (Лангерхан-сове) ћелије, док је мултифункционални протеин S-100 коришћен за идентификацију

макрофага и зрелих дендритичних ћелија, премда и он маркира Лангерхансове ћелије у епителу.

Лангерхансове ћелије се налазе у базалном и спинозном слоју епидерма новорођенчади и младих. Ћелије су крупне, појединачне, округлог облика. Има се утисак да их нема у великом броју у кожи новорођенчади, а да су знатно бројније у кожи особа раног животног доба (сл. 129, 130).

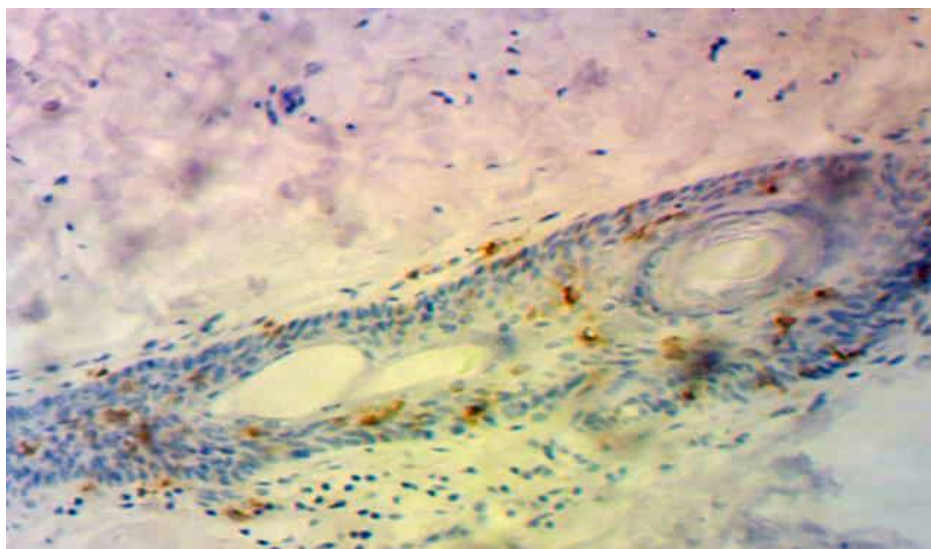


Сл. бр. 129. Лангерхансове ћелије (обојене окер) у базалном и спинозном слоју епидерма новорођенчета. CD1a, 40х, камера 4х.



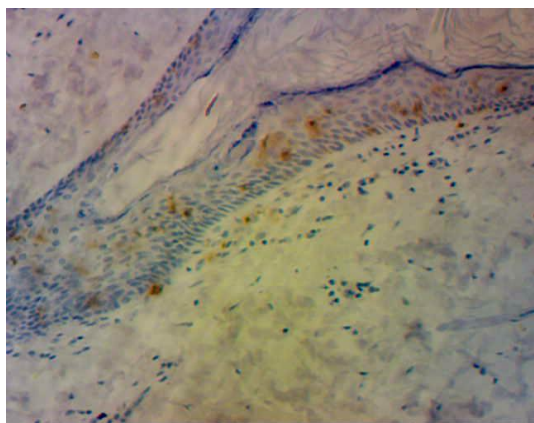
Сл. бр. 130. Мали број Лангерхансових ћелија (обојене окер) у базалном и спинозном слоју епидерма. Дечак, 3г, кожа врата. CD1a, 40х, камера 4х.

На неким узорцима, у кожи младих, приметили смо, око и у фоликулима длака изузетно велики број Лангерхансових ћелија. Ћелије су изузетно крупне, разгранате и бројне и има се утисак да формирају мрежу око длака (сл. 131). Утисак је да их је било више него у самом епидермису.

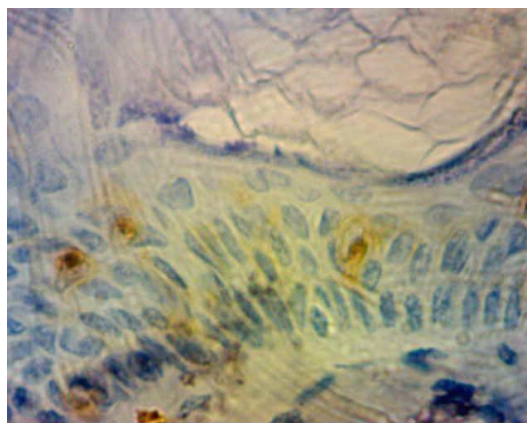


Сл. бр. 131. Мноштво крупних Лангерхансових ћелија око и у фоликулу длаке. Младић, 18г, кожа врата. CD1a, 100X, камера 4х.

На имунохистохемијском бојењу оне приказују карактеристичну морфологију, односно крупно тело и бројне продужетке, усмерене у различитим правцима. Утисак је да су ћелије у површним деловима епидерма, као и у спољашњем омотачу длаке, крупније и разгранатије, док су оне у базалном слоју нешто ситније, заобљеног тела и са мање изданака (сл. 131, 132, 133). Нема разлике ни у морфологији, ни у дистрибуцији, као ни у бројности између коже врата и коже стомака.



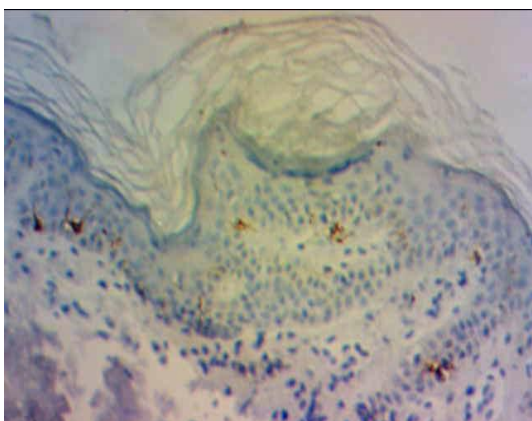
Сл. бр. 132. Изузетно бројне Лангерхансове ћелије које запоседају велики део епидермиса. Младић, 13г, кожа стомака. 40х, камера 4х.



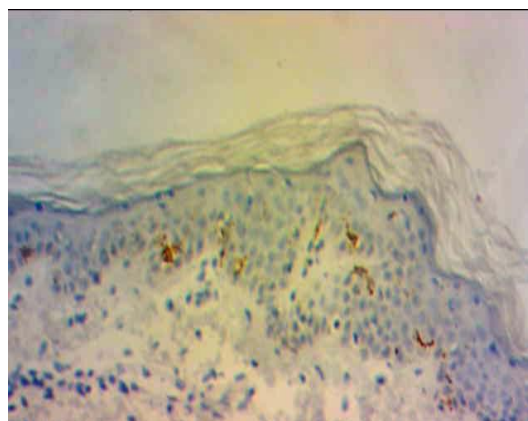
Сл. бр. 133. Крупне, разгранате Лангерхансове ћелије. Дечак, 13г, кожа стомака. CD1a, 400X, камера 4х.

Кожа групе средњег животног доба, такође не показује разлике у особинама Лангерхансових ћелија у односу на регионалну дистрибуцију, а ни у односу на кожу млађег узраста. Мноштво Лангерхансових ћелија је присутно и у базалном и у спинозном слоју епитела (сл. 134, 135).

У кожи позног животног доба и на врату и на стомаку, има мање Лангерхансових ћелија, него у кожи младих и кожи средњег животног доба. Има се утисак да су ћелије на кожи врата ситније и да имају снижен афинитет за боју, као и да су нешто ређе у односу на кожу стомака (сл. 136, 137).



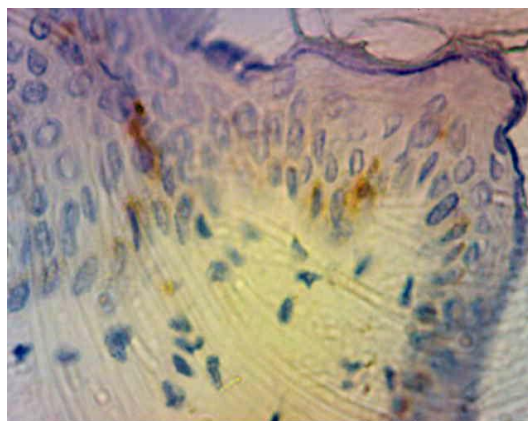
Сл. бр. 134. Мноштво CD1a+ ћелија у епителу. Мушкарац, 37г, кожа врата. CD1a, 100X, камера 4х.



Сл. бр. 135. Мноштво Лангерхансових ћелија (окер боја) у базалном и спинозном слоју епитела. Мушкарац, 37г, кожа стомака. CD1a, CD1a, 100X, камера 4х.

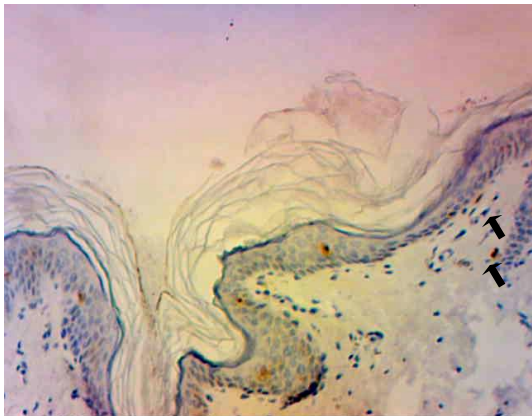


Сл. бр. 136. Ситне Лангерхансове ћелије, претежно у спинозном слоју епитела. Жена, 58г, кожа врата. CD1a, 100X, камера 4х.

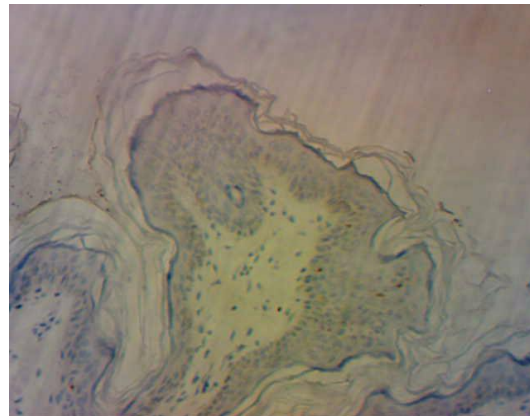


Сл. бр. 137. Неколико разгранатих Лангерхансових ћелија у спинозном слоју епитела. Жена, 58г, кожа врата. CD1a, 400X, камера 4х.

Кожа најстаријих и на врату и на стомаку има јако проређену популацију Лангерхансових ћелија. Ћелије показују снижену имунопозитивност, ситне су и ретке, углавном распоређене у спинозном слоју епидерма (сл. 138, 139).



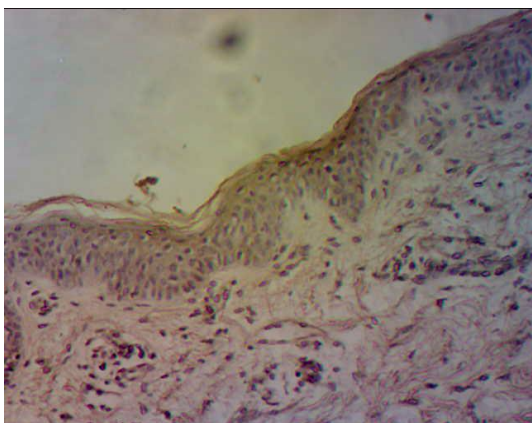
Сл. бр. 138. Ретке Лангерхансове ћелије у атрофичном епидерму. Две Лангерхансове ћелије у дерму (стрелица). Жена 72г, кожа врата. CD1a, 40х, камера 4х.



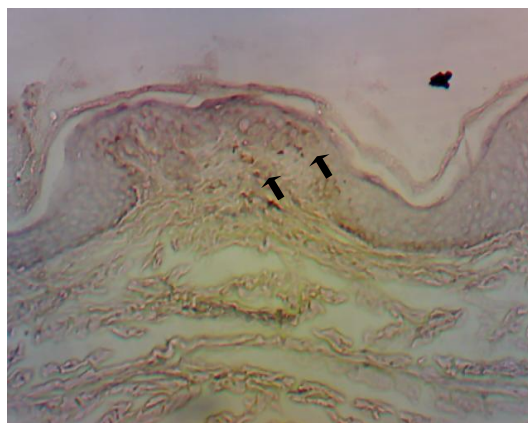
Сл. бр. 139. Ретке и ситне Лангерхансове ћелије. Мушкарац, 73г, кожа стомака. CD1a, 40х, камера 4х.

S-100 протеин је маркер за дендритичне ћелије, макрофаге и Шванове ћелије у везиву, односно меланоците у епителу. Квантификација зрих дендритичних ћелија у дерму извршена је тако што је за сваки узорак од броја ћелија позитивних за S-100 протеин одузет број претходно квантификованих CD68+ ћелија (макрофаги), уз напомену да смо Шванове ћелије елиминисали јер су увек присутне у склопу нерава.

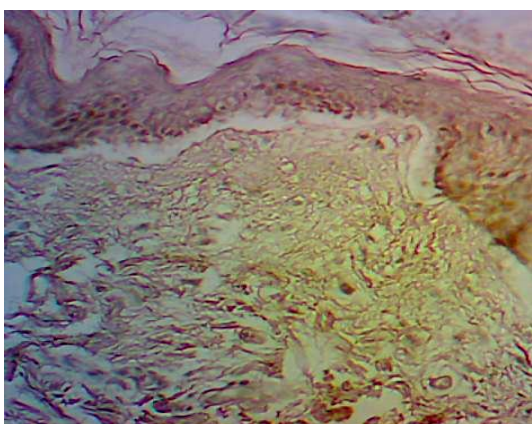
У дерму новорођене деце и особа раног животног доба позитивност на поменути маркер испољавао је мали број ћелија расејаних по читавом дерму, уз напомену да се позитивне ћелије нешто чешће затичу у дермним папилама и периваскуларним просторима, што се поклапа са дистрибуцијом макрофага (сл. 140, 141). Узорци особа средњег, позног и најстаријег животног доба имали су већи број ћелија у дерму, које су исказивале позитивност на поменути маркер и на кожи врата и на кожи стомака, али је због наведене методологије немогуће бити опредељен о којој врсти ћелија се ради. Осим овог коментара сматрамо да даља хистолошка анализа не би била коректна и презентујемо неколико фотографија експресије S-100 протеина ради илустрације и општег увида (сл. 140, 141, 142, 143).



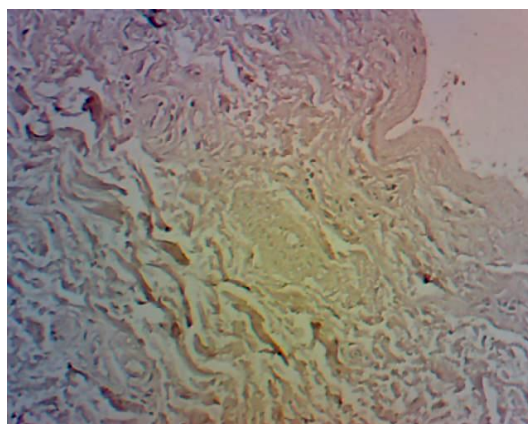
Сл. бр. 140. Појединачне, ретке и ситне 100+ ћелије у дермним папилама. Новорођенче. S-100, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 141. Неколико ретких и ситних S-100+ ћелија (стрелице). Младић, 16г, кожа стомака. S-100, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 142. Неколико група 100+ ћелија у дубоком дерму. Мушкарац 23г, кожа врата. S-100, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 143. Појединачне, ситне 100+ ћелија распоређене између колагених снопова. Мушкарац, 75г, кожа врата. S-100, 40х, камера 4х.

Квантификацијом CD1a+ позитивних ћелија је установљено да епител коже врата новорођене деце садржи просечно 18.21 ± 7.12 ЛТ/мм², да кожа врата раног животног доба има 52.62 ± 10.18 ЛТ/мм², а кожа врата особа средњег животног доба 40.03 ± 12.18 ЛТ/мм². Група особа позног животног доба имају просечно 21.26 ± 19.65 ЛТ/мм² на кожи врата, док је у групи најстаријих тај број 12.04 ± 9.76 ЛТ/мм². Кожа стомака новорођене деце има просечно 16.74 ± 5.61 ЛТ/мм², а кожа раног животног доба 49.31 ± 12.38 ЛТ/мм². Просечан број ЛТ/мм² у групи средњег животног доба је 46.89 ± 16.75 ћелија/мм², а групи особа старости 41 до 60 година 37.12 ± 10.66 ћелија/мм². Најстарији на кожи стомака имају просечно 19.62 ± 11.28 ћелија/мм² (Табела бр. 12; Графикон бр. 12).

Средњи број ЛТ/мм² у групи раног животног доба статистички је значајно већи у односу и на кожу врата, и на кожу стомака новорођене деце ($P < 0,001$), док

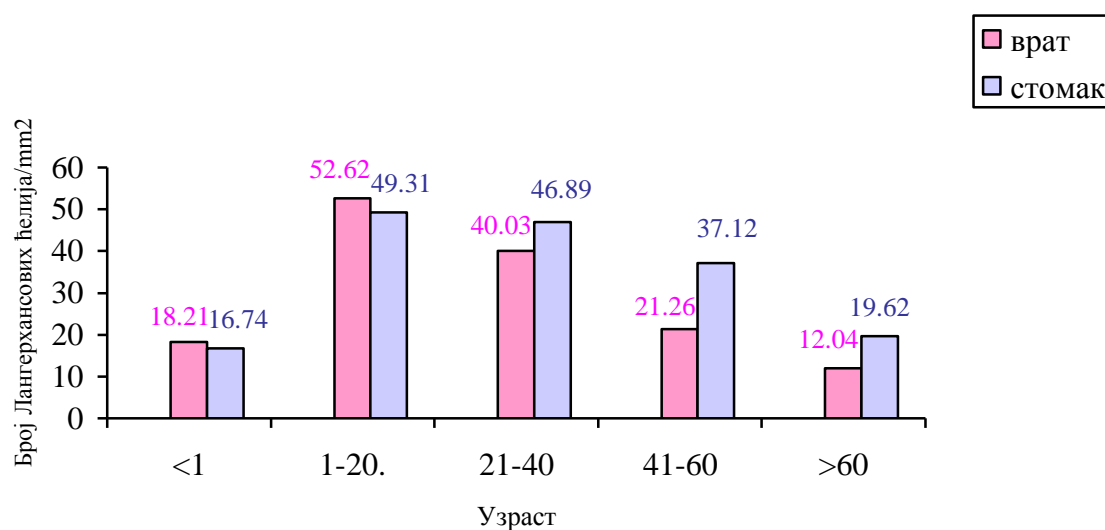
разлика у просечном броју ЛН/mm² између коже врата и коже стомака у групи новорођенчади није статистички значајна. Мањи средњи број ЛН/mm² у кожи врата, у односу на рано животно доба има група средњег животног доба (P<0,01) док разлика у просечном броју ЛН/mm² између коже врата и коже стомака у групи раног животног доба није статистички значајна. Група позног животног доба на кожи врата (P<0,01) и на кожи стомака (P<0,05), има значајно мањи број ћелија у односу на средње животно доба, док разлика у просечном броју ЛН/mm² коже врата и стомака групе средњег животног доба није статистички значајна. Статистички значајно мањи просечан број ЛН/mm² се региструје у кожи стомака најстаријих, у односу на групу позног животног доба (P<0,01), док на врату није евидентирана статистички значајна разлика. Група најстаријих, на кожи врата, има значајно мањи број ћелија у односу на кожу врата средњег животног доба (P<0,001). И у оквиру групе позног животног доба, на кожи врата се региструје статистички значајно мањи број ћелија него у кожи стомака (P<0,01). Између коже врата и коже стомака у групи најстаријих такође се евидентира статистички значајна разлика у просечном броју ЛН/mm² (P<0,01) .

Табела бр. 12. Број Лангерхансових ћелија по mm² епитела коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата		врат vs стомак	Кожа стомака	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	18.21	7.12		16.74	5.61
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	52.62 a***	10.18		49.31 a***	12.38
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	40.03 b**	12.18		46.89	16.75
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	21.26 c**	19.65	**	37.12 c*	10.66
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	12.04 c***	9.76	*	19.62 d***	11.28

* - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001

a - vs новорођенчад, b - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон бр. 12. Број Лангерхансових ћелија по mm² епитела коже у испитиваним групама

Квантификацијом S-100+ ћелија и одузимањем CD68+ ћелија (макрофаги) је установљено да дерм коже врата новорођене деце садржи просечно 5.04 ± 1.18 дендритичних ћелија/mm², да кожа врата раног животног доба има 22.23 ± 14.32 дендритичних ћелија/mm², а кожа врата особа средњег животног доба 50.83 ± 21.23 дендритичних ћелија/mm². Група особа позног животног доба имају просечно 58.27 ± 23.26 дендритичних ћелија/mm² на кожи врата, док је у групи најстаријих тај број 42.81 ± 20.19 дендритичних ћелија/mm². Кожа стомака новорођене деце има просечно 4.28 ± 1.74 дендритичних ћелија/mm², а кожа раног животног доба 20.14 ± 17.31 /mm². Просечан број дендритичних ћелија/mm² у групи средњег животног доба је 33.06 ± 22.68 ћелија/mm², а групи особа старости 41 до 60 година 39.21 ± 18.27 дендритичних ћелија/mm². Најстарији на кожи стомака имају просечно 45.26 ± 26.18 дендритичних ћелија/mm² (Табела бр. 13; Графикон бр. 13).

Средњи број дендритичних ћелија/mm² у групи раног животног доба статистички је значајно већи у односу и на кожу врата, и на кожу стомака новорођене деце ($P < 0,01$), док разлика у просечном броју дендритичних ћелија/mm² између коже врата и коже стомака у групи новорођенчади није статистички значајна, као и у групи раног животног доба. Већи средњи број дендритичних ћелија/mm² и у кожи врата ($P < 0,01$) и у кожи стомака, у односу на рано животно доба има група средњег животног доба ($P < 0,05$). Група позног животног доба има приближно исти број ћелија као средње животно доба, а просечан број дендритичних ћелија/mm² коже врата у

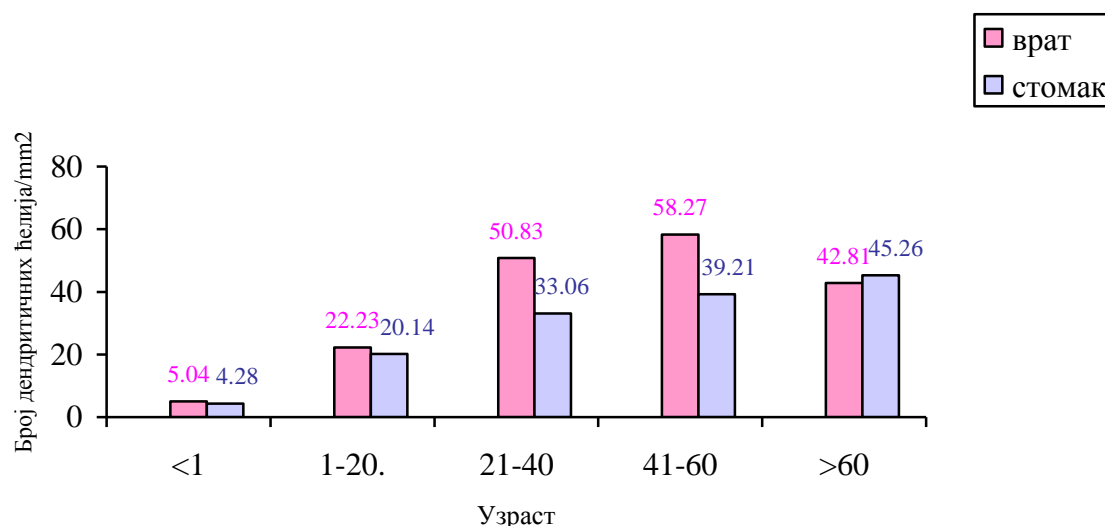
односу на кожу стомака, групе средњег животног доба је статистички значајно већи ($P<0,05$). Статистички значајно мањи број ћелија има група најстаријих на врату ($P<0,05$), у односу на позно животно доба. Значајно већи број ћелија има кожа врата у односу на кожу стомака у групи позног животног доба ($P<0,01$), док се таква разлика не евидентира у групи најстаријих. Кожа стомака позног и најстаријег животног доба има значајно више дендритичних ћелија у односу на кожу стомака раног животног доба ($P<0,01$; $P<0,01$).

Табела бр.13. Број зрелих дендритичних ћелија по mm^2 дерма коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата		врат vs стомак	Кожа стомака	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	5.04	1.18		4.28	1.74
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	22.23 a**	14.32		20.14 a**	17.31
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	50.83 b**	21.23	*	33.06 b*	22.68
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	58.27	23.26	**	39.21 c**	18.27
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	42.81 d*	20.19		45.26 c**	26.18

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

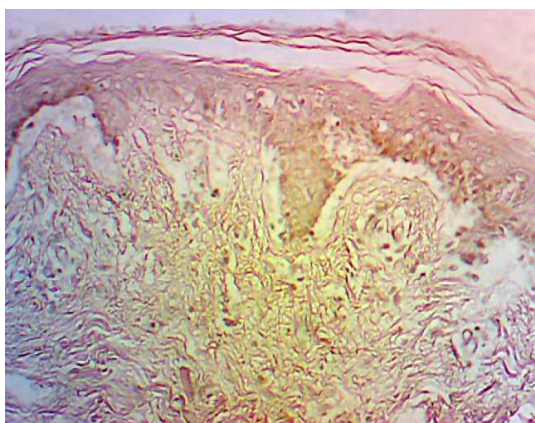
a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



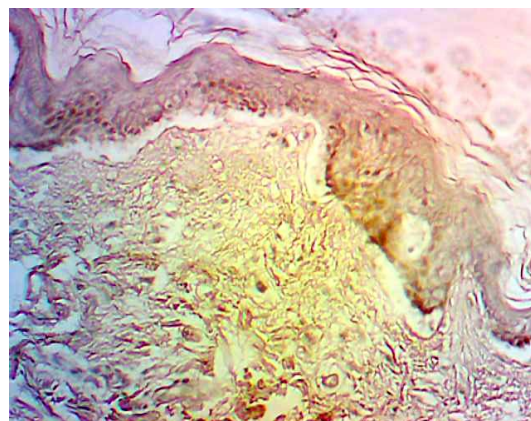
Графикон бр.13. Број зрелих дендритичних ћелија по mm^2 дерма коже у испитиваним групама

5.3.2. Дистрибуција и квантификација меланоцита

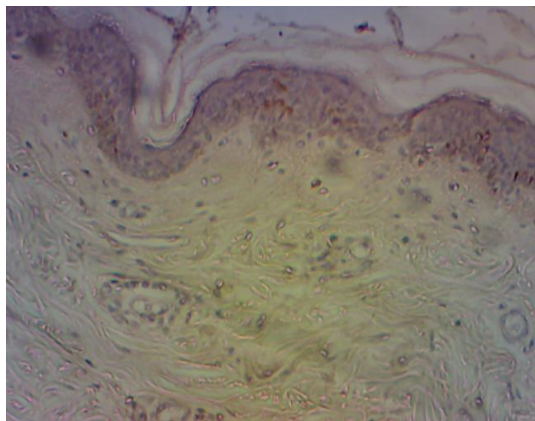
S-100 протеин је маркер не само за дендритичне ћелије, већ и за макрофаге и Шванове ћелије у везиву, односно меланоците и Лангехансове ћелије у епителу. Број меланоцита смо израчунали посредно тако што смо од укупног броја S-100 + ћелија у епидермису одузели број Лангерхансових ћелија, које су показивале имунореактивност на CD1a маркер. Због овакве методологије не можемо имати прави утисак дистрибуције меланоцита, без обзира што се меланоцити искључиво налазе у базалном слоју епидермиса, а Лангерхансове ћелије углавном у спинозном слоју, мада смо видели да им због њиховог кретања ни позиција у базалном слоју није страна. Сматрамо да хистолошка анализа не би била коректна и презентујемо неколико фотографија експресије S-100 протеина ради илустрације и општег увида (сл. 144, 145, 146, 147, 148, 149).



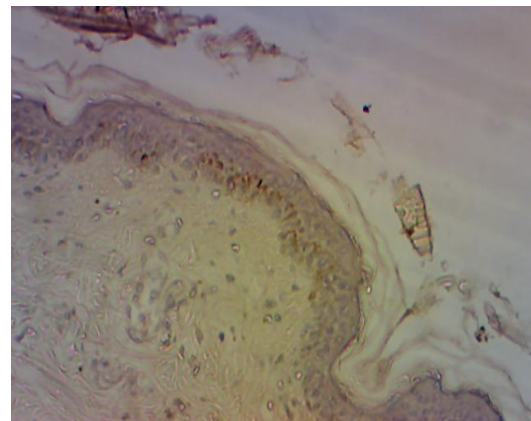
Сл. бр. 144. У епидермису се запажа велика зона без S-100+ ћелија и једна група са имунопозитивношћу. Младић, 16г, кожа стомака. S-100, 40х, камера 4х.



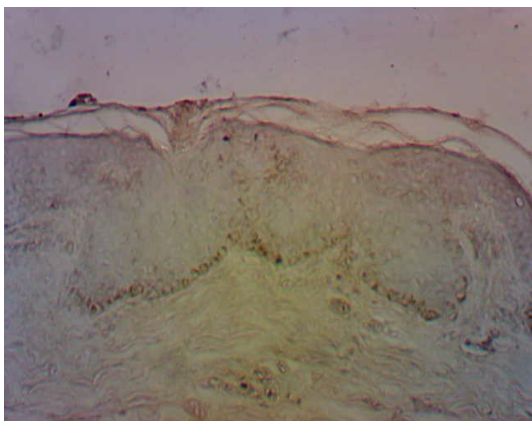
Сл. бр. 145. Три групе S-100+ ћелија у епидермису. Мушкарац 23г, кожа врата. S-100, 40х, камера 4х.



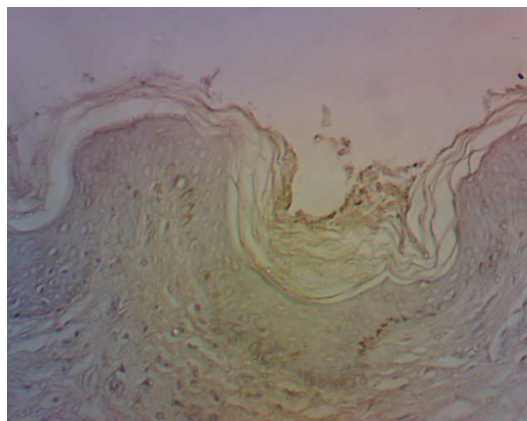
Сл. бр. 146. Неколико групица S-100+ ћелија у епидермису. Жена 46г, кожа врата. S-100, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 147. Мали број S-100+ ћелија у епидермису. Жена 46г, кожа стомака. S-100, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 148. У акантотично промењеном епидермису види се један ред S-100 имунопозитивних ћелија у базалном слоју, које су вероватно меланоцити. Жена, 47г, кожа врата, S-100, 40х, камера 4х.



Сл. бр. 149. Мали број S-100+ ћелија, у базалном слоју епитељу. Жена, 68г, кожа врата. S-100, 40х, камера 4х.

Квантификацијом је установљено да епител коже врата новорођене деце садржи просечно 4.21 ± 2.56 меланоцита/ mm^2 , да кожа врата раног животног доба има 18.32 ± 9.24 меланоцита/ mm^2 , а кожа врата особа средњег животног доба 29.28 ± 9.82 меланоцита/ mm^2 . Група особа позног животног доба има просечно 23.31 ± 11.26 меланоцита/ mm^2 на кожи врата, док је у групи најстаријих тај број 10.82 ± 5.72 меланоцита/ mm^2 . Кожа стомака новорођене деце има просечно 3.97 ± 2.02 меланоцита/ mm^2 , а кожа раног животног доба 16.05 ± 11.26 меланоцита/ mm^2 . Просечан број меланоцита/ mm^2 у групи средњег животног доба је 21.75 ± 12.18 ћелија/ mm^2 , а групи особа старости од 41 до 60 година 13.86 ± 9.72 меланоцита/ mm^2 . Најстарији на кожи стомака имају просечно 12.56 ± 7.58 ћелија/ mm^2 (Табела бр. 14; Графикон бр. 14).

Средњи број меланоцита/ mm^2 у групи раног животног доба статистички је значајно већи у односу и на кожу врата ($P < 0,001$), и на кожу стомака новорођене деце ($P < 0,01$), док разлика у просечном броју меланоцита/ mm^2 између коже врата и коже стомака у групи новорођенчади није статистички значајна. Већи средњи број меланоцита/ mm^2 у кожи врата, у односу на рано животно доба има група средњег животног доба ($P < 0,01$), док разлика у просечном броју меланоцита/ mm^2 , на кожи стомака ових група, као и између коже врата и коже стомака у групи раног животног доба, није статистички значајна. Група позног животног доба на кожи стомака има значајно мањи број меланоцита/ mm^2 у односу на средње животно доба ($P < 0,05$). Унутар саме групе средњег животног доба, региструје се статистички значајно већи

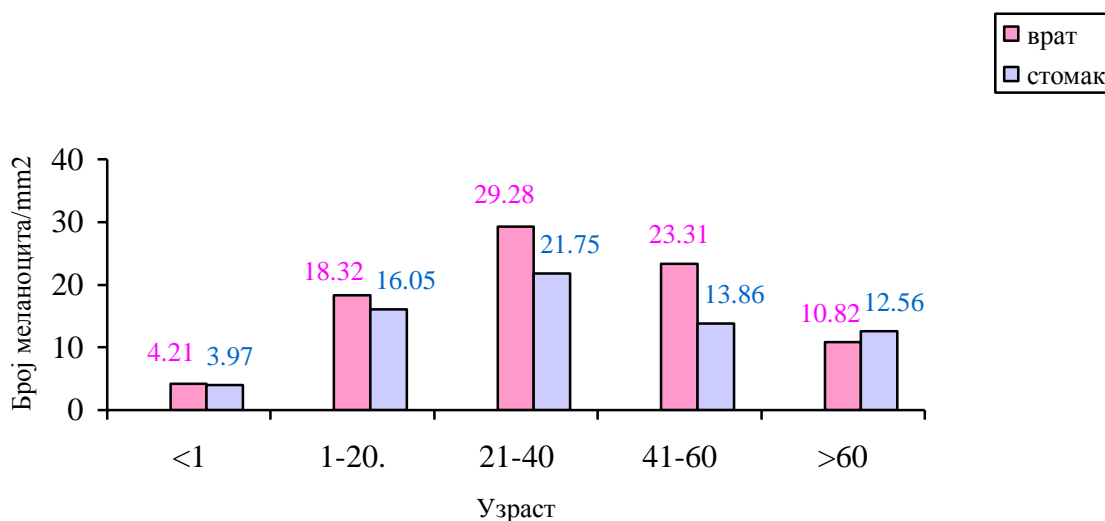
број ћелија у кожи врата у односу на кожу стомака ($P<0,05$). Статистички значајно мањи просечан број меланоцита/ mm^2 се региструје у кожи врата најстаријих, у односу на групу позног животног доба ($P<0,01$), док на стомаку није евидентирана статистички значајна разлика. Значајно мањи број меланоцита/ mm^2 има кожа стомака у односу на кожу врата унутар групе позног животног доба ($P<0,01$). Између коже врата и коже стомака у групи најстаријих се не евидентира статистички значајна разлика у просечном броју меланоцита / mm^2 , док кожа стомака, групе најстаријих има значајно мање меланоцита у односу на кожу стомака групе средњег животног доба ($P<0,05$).

Табела бр. 14. Број меланоцита по mm^2 епидерма коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата		врат vs стомак	Кожа стомака	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	4.21	2.56		3.97	2.02
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	18.32 a***	9.24		16.05 a***	11.26
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	29.28 б**	9.82	*	21.75	12.18
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	23.31	11.26	**	13.86 с*	9.72
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	10.82 d**	5.72		12.56 с*	7.58

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон бр. 14. Број меланоцита по mm^2 епидерма коже у испитиваним групама

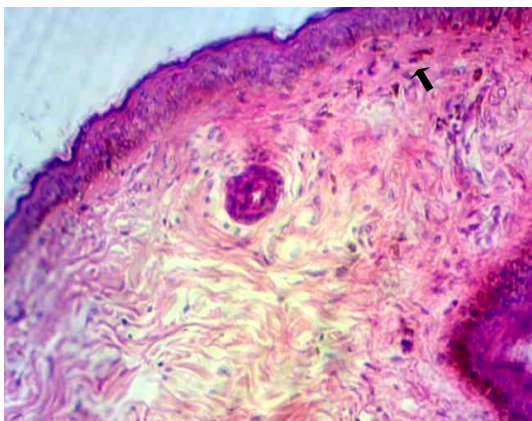
5.3.3. Дистрибуција и квантификација макрофага

Светлосним микроскопом, макрофаги дермиса не могу лако да се разликују од фибробласта и неких других ћелија дермиса, посебно на НЕ бојењу. Међутим, када су активни, у њима се виде бројне фагоцитне вакуоле и тада се лако уочавају. У фагоцитним вакуолама макрофага дермиса често могу да се уоче меланозоми, и то обично више меланозома у једној вакуоли. Такви макрофаги представљају меланофаге и виде се често уз мастоците, посебно на узорцима који су бојени техникама које детектују ову врсту ћелија (сл. 150, 151, 152, 153, 154, 155).

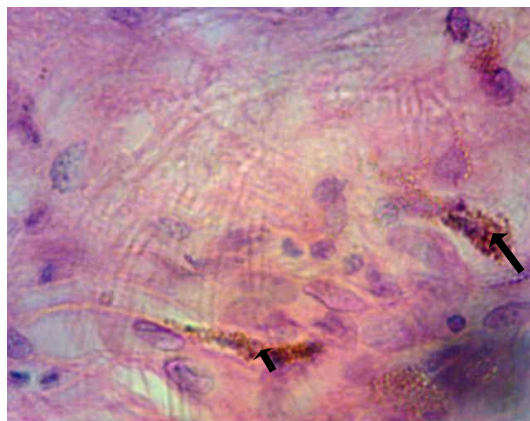
За детекцију макрофага коришћена су моноклонска антитела против глико-протеина CD68 који се експримује на плазмалемни ћелија моноцитно-макрофагне лозе.

Кожа фетуса и новорођене деце садржи приметно мањи број макрофага у односу на кожу старијих група. У кожи раног животног доба је број макрофага приметно већи него код беба, равномерно распоређен у везиву дерма, али се ове ћелије неретко виђају у непосредном контакту са епителном базалном ламином или међу сноповима колагених влакана. Такође смо запазили дистрибуцију макрофага и око себацеалних жлезда, посебно у узорцима коже врата особа у раном животног добу (сл. 156, 157).

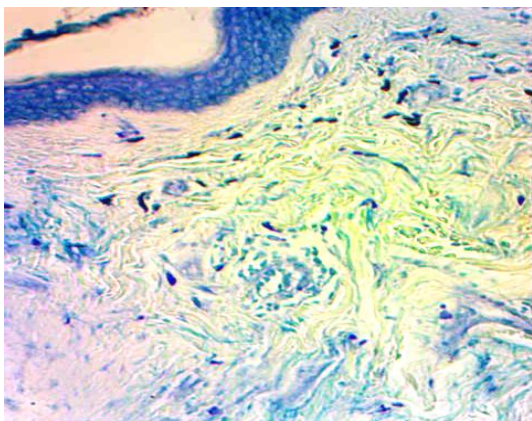
Дистрибуција макрофага слична је и у истраживаним групама средњег животног доба и на кожи врата и на кожи стомака. На неким узорцима, коже врата, запажају се групице макрофага у запаљенским инфилтратима (сл. 158), док смо на узорцима коже стомака овог животног доба, регистровали углавном само појединачне ћелије (сл. 159). Нешто већи број макрофага региструје се у кожи врата позног животног доба, без неких посебних карактеристика. Наиме, на узорцима коже врата позног и најстаријег животног доба макрофаги се уочавају као појединачне, крупне ћелије, између остатака колагених влакана у дерму (сл. 160, 161), или као групице ћелија, веће или мање концентрације, унутар или око остатака колагених влакана. Макрофаги се у великој концентрацији налазе и у запаљенским инфилтратима, где заузимају углавном централну позицију (сл. 162). Анализом истраживаног материјала може се закључити да су дистрибуција и заступљеност макрофага релативно уједначена у кожи стомака у групама позног и најстаријег животног доба, без неких посебних обележја (сл. 163).



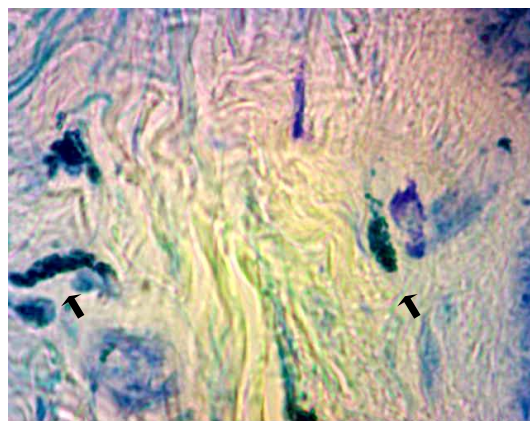
Сл. бр. 150. Макрофаги (меланофаги), у папиларном дерму. Девојчица 8г, кожа стомака. HE, 40X камера 4х.



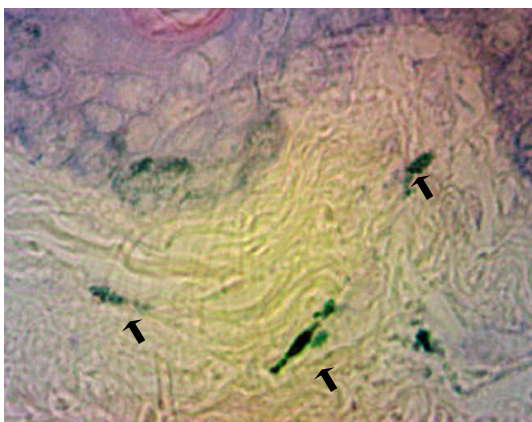
Сл. бр. 151. У макрофагима се запажају фагоцитне вакуоле, испуњене меланозомима. Девојчица 8г, кожа стомака. HE, 400X, камера 4х.



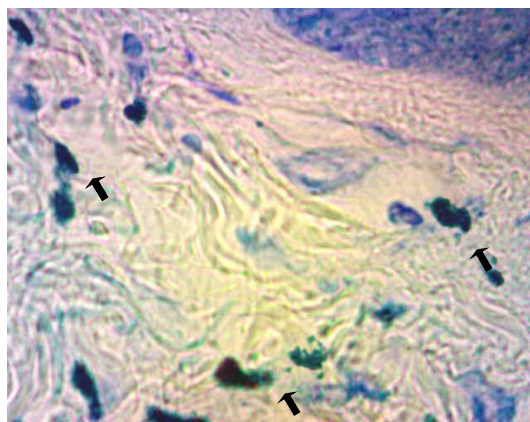
Сл. бр. 152. Бројни меланофаги у дерму. Мушкарац, 23г, кожа стомака. Giemsa, 40X, камера 4х.



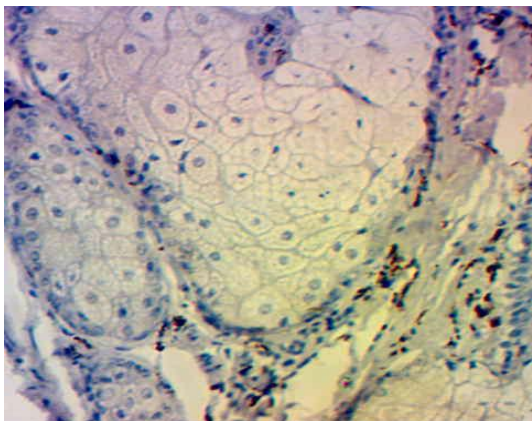
Сл. бр. 153. Меланофаги уз мастоцитите. Мушкарац, 23г, кожа стомака. Giemsa, 400X камера 4х.



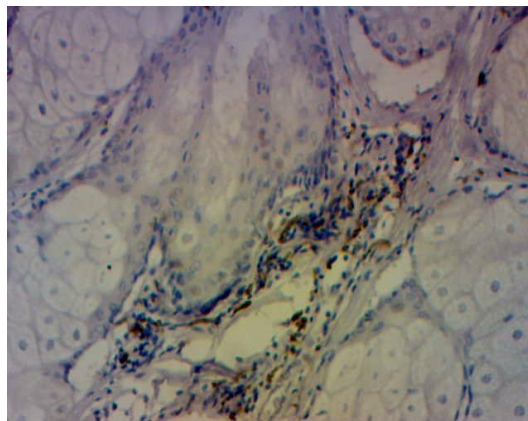
Сл. бр. 154. Неколико меланофага у дерму. Жена, 59г, кожа врата. Toluidin blue, 400X камера 4х.



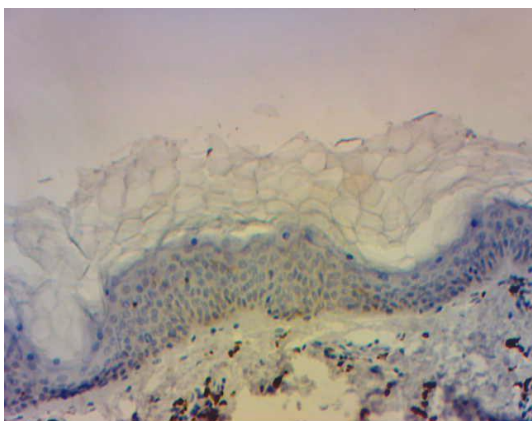
Сл. бр. 155. Бројни меланофаги удружени са мастоцитима. Мушкарац, 77г, кожа врата. Giemsa, 400X , камера 4х.



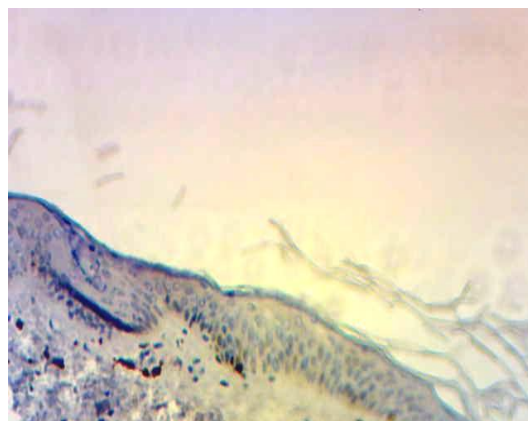
Сл. бр. 156. Повећан број макрофага између себацеалних жлезда. Дечак, 16г, кожа врата. CD68, 40X, камера 4х.



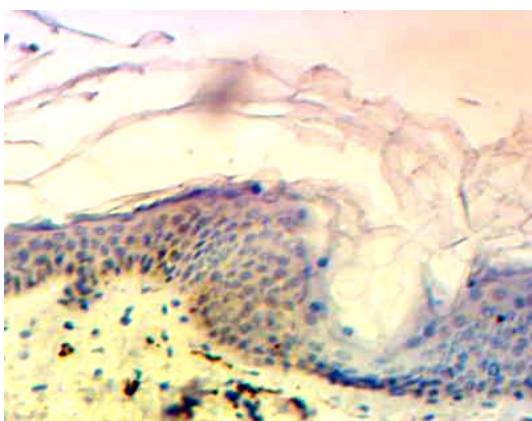
Сл. бр. 157. Изузетно велики број макрофага између себацеалних жлезда. Младић, 19г, кожа врата. CD68, 40X, камера 4х.



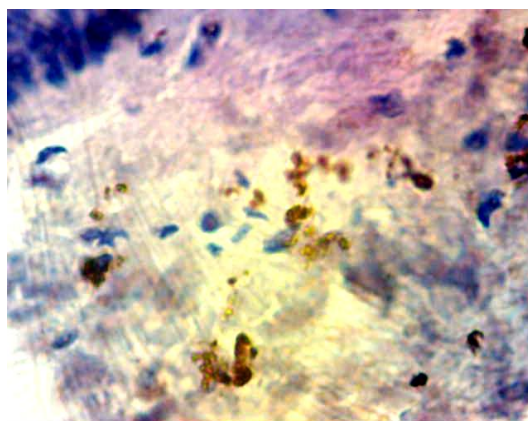
Сл. бр. 158. Запаљењско жариште у центру слике садржи мноштво макрофага који формирају мање групице. Мушкарац, 39г, кожа врата. CD68, 100X, камера 4х.



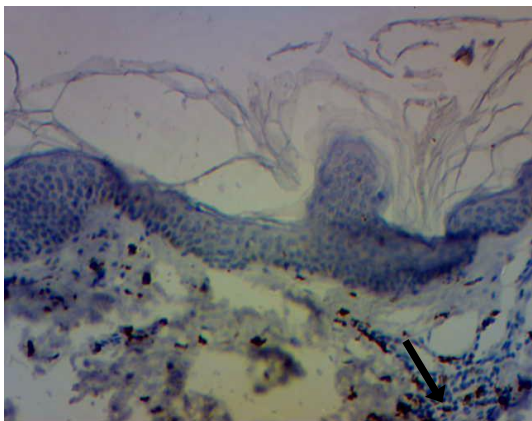
Сл. бр. 159. Неколико макрофага у папиларном дерму. Мушкарац, 39г, кожа стомака. CD68, 200X, камера 4х.



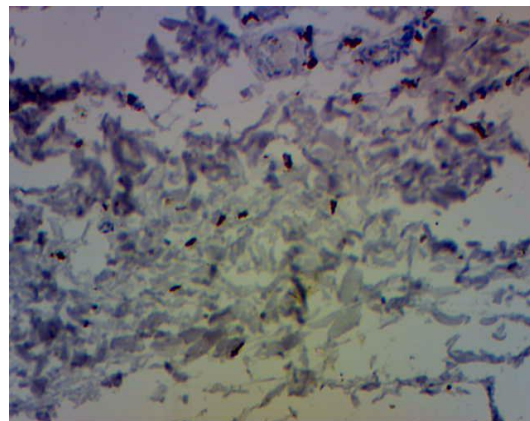
Сл. бр. 160. Појединачни макрофаги присутни у папиларном и ретикуларном дерму. Жена 53г, кожа врата. CD68, 100X, камера 4х.



Сл. бр. 161. Равномерно распоређени макрофаги у дерму. Жена 53г, кожа врата. CD68, 200х, камера 4х.



Сл. бр. 162. Равномерно распоређени макрофаги у једном делу дерма и груписани у запаљенском инфилтрату (стрелица). Жена, 69г, кожа врата. CD68, 100х, камера 4х.



Сл. бр. 163. Неколико равномерно распоређених макрофага у дерму око остатака колагених влакана. Мушкарац, 77г, кожа стомака. CD68, 100х, камера 4х.

Квантификацијом CD68+ ћелија је установљено да дерм коже врата новорођене деце садржи просечно 12.51 ± 7.88 макрофага/ mm^2 , да кожа врата раног животног доба има 48.24 ± 17.42 макрофага/ mm^2 , а кожа врата особа средњег животног доба 63.15 ± 33.12 макрофага/ mm^2 . Група особа позног животног доба имају просечно 86.00 ± 49.70 макрофага/ mm^2 на кожи врата, док је у групи најстаријих тај број 74.23 ± 54.18 макрофага/ mm^2 . Кожа стомака новорођене деце има просечно 8.39 ± 7.38 макрофага/ mm^2 , а кожа раног животног доба 44.79 ± 14.56 макрофага/ mm^2 . Просечан број макрофага/ mm^2 у групи средњег животног доба је 42.23 ± 19.31 ћелија/ mm^2 , а групи особа старости 41 до 60 година 57.18 ± 26.28 макрофага/ mm^2 . Најстарији у кожи стомака имају просечно 66.57 ± 37.39 ћелија/ mm^2 (Табела бр. 15; Графикон бр. 15).

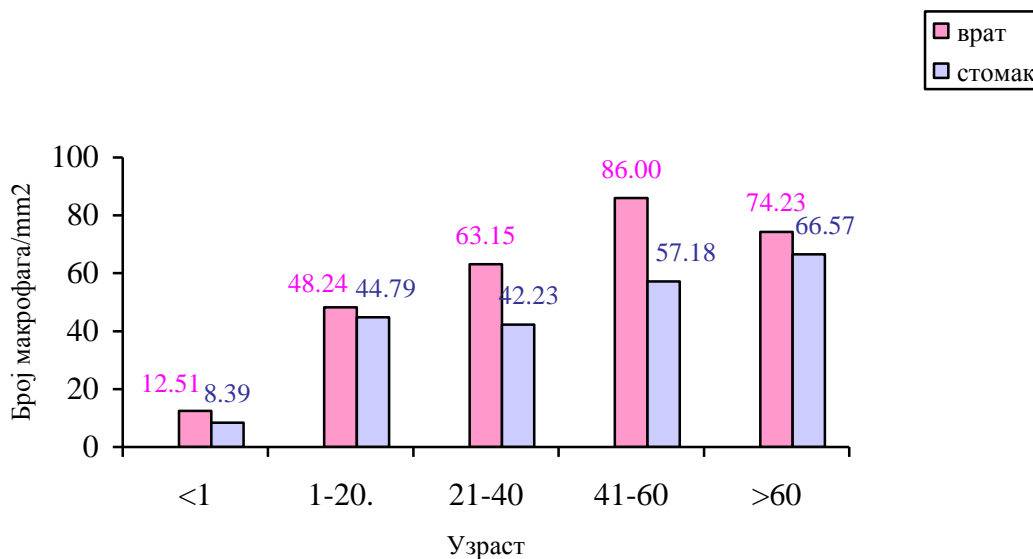
Средњи број макрофага/ mm^2 у групи раног животног доба статистички је значајно већи у односу на кожу врата и кожу стомака новорођене деце ($P < 0,001$), док разлика у просечном броју макрофага/ mm^2 између коже врата и коже стомака унутар саме групе новорођенчади, као и групе раног животног доба, није статистички значајна. Групе средњег и позног животног доба на врату, имају значајно већи број макрофага/ mm^2 , у односу на кожу стомака ($P < 0,05$). На кожи врата групе позног ($P < 0,01$) и најстаријег ($P < 0,05$) животног доба има значајно више макрофага у односу на кожу врата раног животног доба. Кожа стомака најстаријег животног доба има значајно више макрофага у односу на кожу стомака групе раног животног доба ($P < 0,05$). Разлика у броју макрофага/ mm^2 није евидентирана у групи најстаријих између коже врата и стомака.

Табела бр. 15. Број макрофага по mm^2 коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата		врат vs стомак	Кожа стомака	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	12.51	7.88		8.39	7.38
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	48.24 a***	17.42		44.79 a***	14.56
2. група (од 21. до 40. год) (средње животно доба)	20	63.15	33.12	*	42.23	19.31
3. група (од 41. до 60. год) (позно животно доба)	20	86.00 b**	49.70	*	57.18	26.28
4. група (преко 60 година) (најстарије животно доба)	20	74.23 b*	54.18		66.57 b*	37.39

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$

a - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.

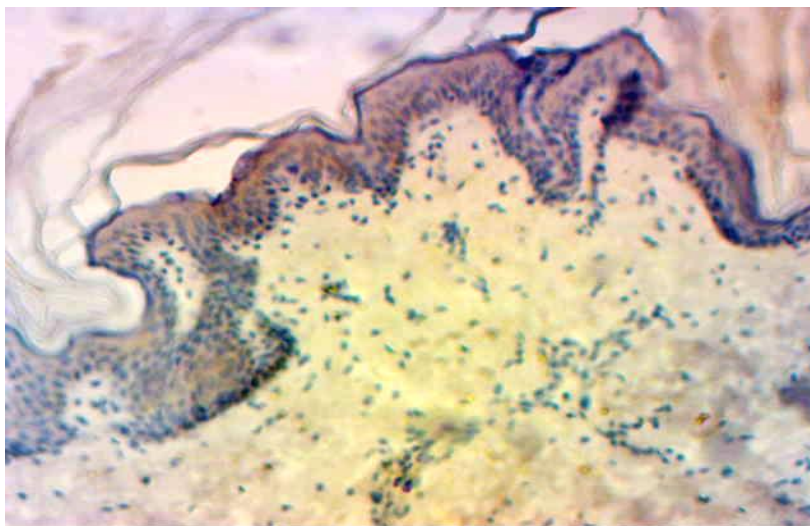


Графикон 15. Број макрофага по mm^2 коже у испитиваним групама

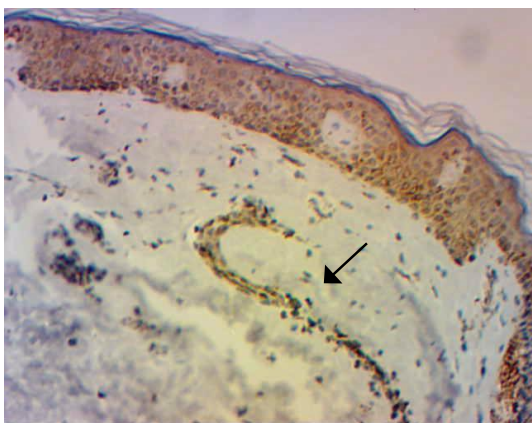
5.3.4. Имунохистохемијски резултати експресије васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF)

Идентификација промењених крвних судова у дерму, вршена је преко VEGF маркера. Ниво експресије VEGF-а је оцењен у складу са системом бодовања који оцењује степен позитивности и интензитет бојења, ћелија које експримују овај маркер.

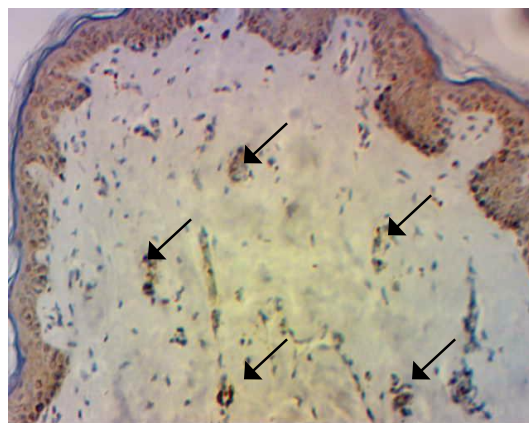
У младој кожи (кожа новорођенчади и раног животног доба) готово и да нема експресије VEGF-а или је она минимална и уочава се око неизмењених крвних судова у дерму (сл. 164). Кожа средњег животног доба и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној регији, исказује експресију цитокина VEGF-а, са ниским степеном имунопозитивности и релативног интензитета позитивно обојених ћелија, углавном у зиду малих капиларних петљи, у папиларном и ретикуларном дерму, али се на неким препаратима може видети експресија и у зиду већих крвних судова (сл. 165, 166). У кожи врата позног и најстаријег животног доба запажа се различити степен имунопозитивности и релативног интензитета позитивно обојених ћелија, али је он углавном већи, у односу на средње животно доба, као и у односу на кожу стомака унутар ових група (сл. 171). Изражена експресија VEGF-а се запажа у зиду дилатираних крвних судова у ретикуларном дерму (сл. 167, 168, 169, 170, 172).



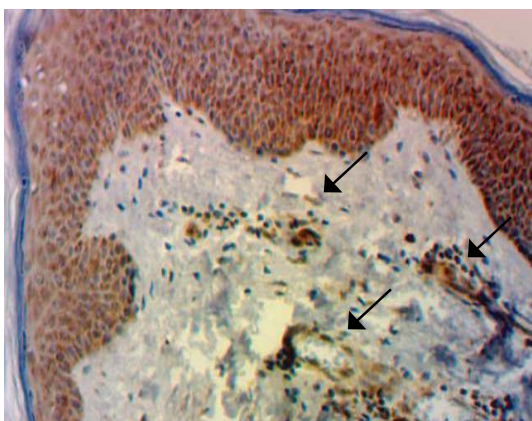
Сл. бр. 164. Негативна експресија VEGF-а у дерму коже. Дечак, 8г, кожа врата. VEGF, 40X, камера 4x.



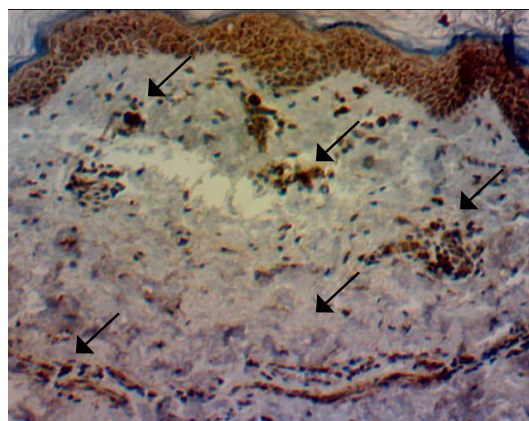
Сл. бр. 165. Изражена експресија VEGF-а око једног већег крвног суда у дерму (стрелица). Степен имунопозитивности 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Жена, 37г, кожа врата. VEGF, 40X, камера 4х.



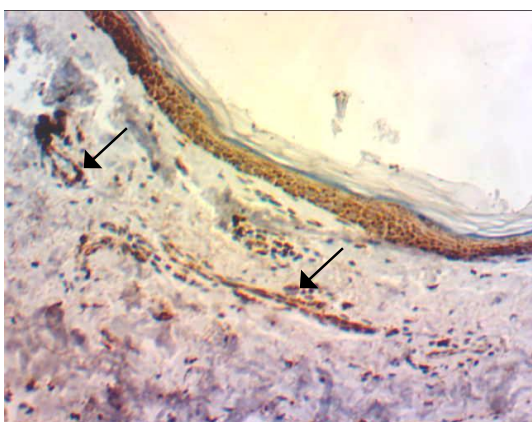
Сл. бр. 166. Око капиларних петљи у дерму се запажају VEGF имунопозитивне ћелије (стрелице). Степен имунопозитивности 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Жена, 37г, кожа стомака. VEGF, 40X, камера 4х.



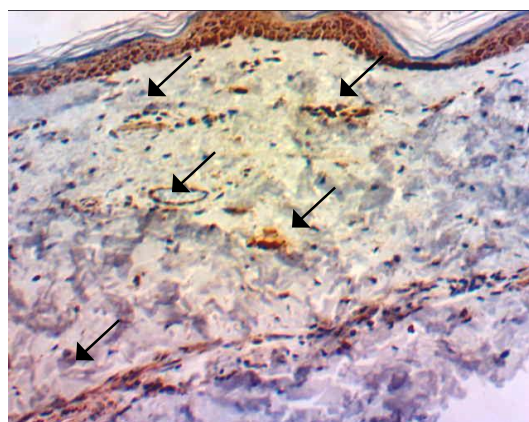
Сл. бр. 167. Изражена експресија VEGF-а око дилатираних крвних судова у дерму. Степен имунопозитивности 2, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Мушкарац, 59г, кожа врата. VEGF, 40X, камера 4х.



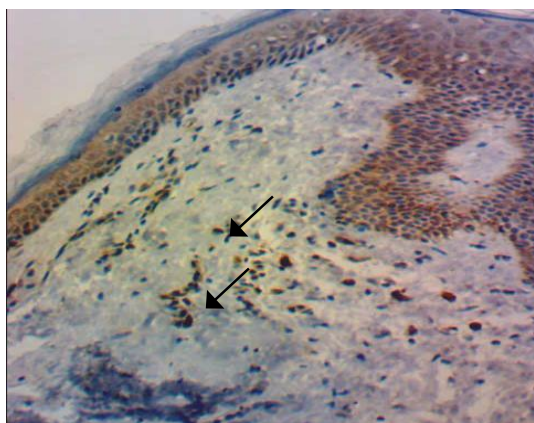
Сл. бр.168. VEGF маркира крвне судове у дерму. Степен имунопозитивности 2, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Жена, 58г, кожа врата, VEGF, 40X, камера 4х.



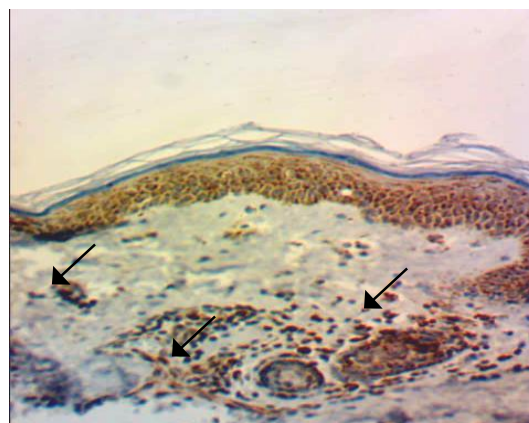
Сл. бр. 169. Степен имунопозитивности на VEGF је 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Жена 69г, кожа врата, VEGF, 40X, камера 4х.



Сл. бр. 170. Степен имунопозитивности на VEGF је 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Мушкарац, 73г, кожа врата, VEGF, 40X, камера 4х.



Сл. бр. 171. Степен имунопозитивности на VEGF је 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Мушкарац, 73г, кожа стомака .VEGF, 40X, камера 4x.



Сл. бр. 172. Степен имунопозитивности на VEGF је 2, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Мушкарац, 77г, кожа врата VEGF, 40X, камера 4x.

Мерењем степена имунопозитивности и релативног интензитета позитивно обојених ћелија на VEGF, установљено је да у кожи врата и стомака новорођене деце нема експресије VEGF-а. Кожа врата раног животног доба има скор експресије VEGF-а од 0.32 ± 0.06 , а кожа врата особа средњег животног доба 0.37 ± 0.10 . Група особа позног животног доба имају скор експресије од 4.18 ± 2.32 на кожи врата, док у групи најстаријих та вредност износи 3.78 ± 1.56 . Кожа стомака раног животног доба има скор од 0.28 ± 0.09 . У групи средњег животног доба вредност скорa је 0.34 ± 0.12 , а групи особа старости од 41 до 60 година 1.21 ± 0.93 . Најстарији на кожи стомака имају скор експресије од 1.47 ± 0.98 (Табела бр. 16; Графикон бр. 16).

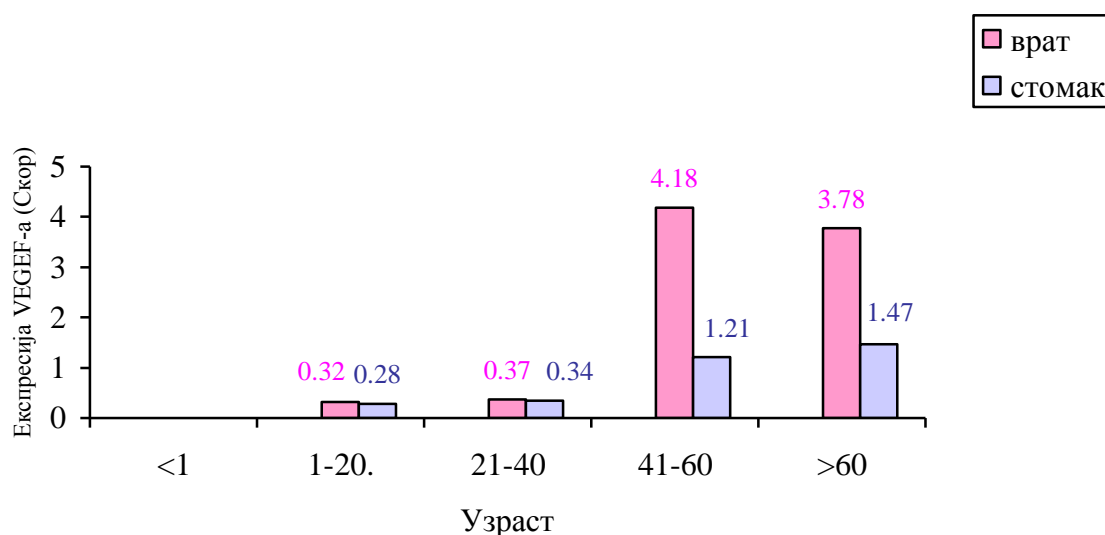
Скор експресије VEGF-а на кожи врата и стомака, у групи раног животног доба статистички се значајно не разликује у односу на кожу врата и стомака групе средњег животног доба, као и унутар саме групе раног животног доба. Група позног животног доба на кожи врата, има значајно већи скор у односу на средње животно доба ($P < 0,001$), као и на кожи стомака ($P < 0,01$). Унутар групе средњег животног доба није регистрована статистички значајна разлика у нивоу скорa експресије VEGF-а у кожи врата, у односу на кожу стомака. Статистички значајно мањи скор се региструје у кожи стомака, у односу на кожу врата групе позног животног доба ($P < 0,001$), док статистички значајна разлика у односу на групу најстаријих, ни на кожи врата, ни на кожи стомака, није евидентирана. У групи најстаријих такође се евидентира статистички значајно већи скор у кожи врата у односу на кожу стомака исте групе ($P < 0,001$).

Табела бр. 16. Експресија VEGF-а у кожи испитиваних група

Група	N	Кожа врата (Скор)		врат vs стомак	Кожа стомака (Скор)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	0	0		0	0
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	0.32	0.06		0.28	0.09
2. група (од 21. до 40г) (средње животно доба)	20	0.37	0.10		0.34	0.12
3. група (од 41. до 60г) (позно животно доба)	20	4.18 с***	2.32	***	1.21 с**	0.93
4. група (преко 60г) (најстарије животно доба)	20	3.78	1.56	***	1.47	0.98

* - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001

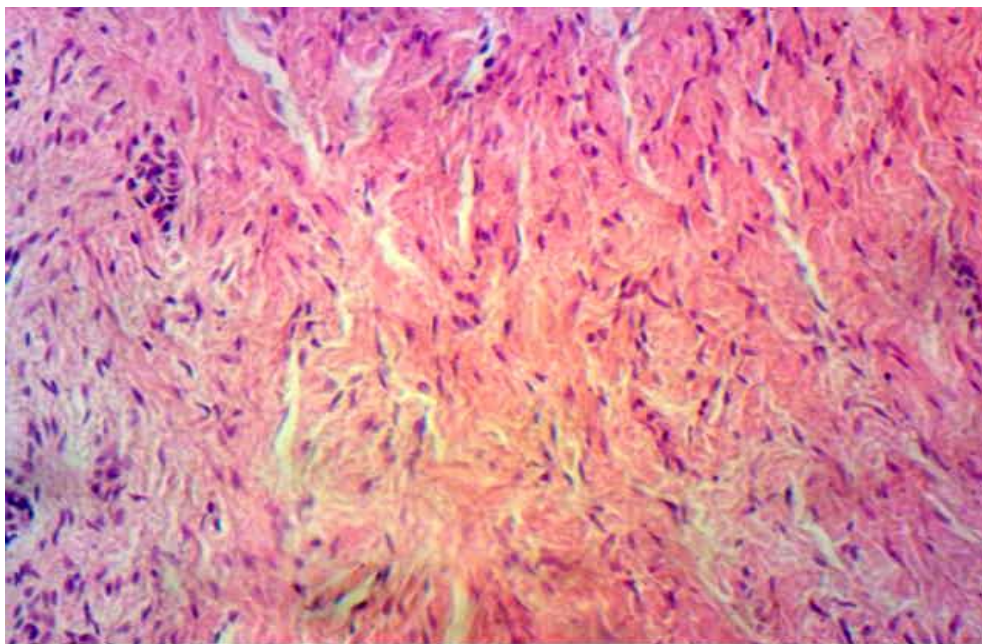
а - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон 16. Експресија VEGF-а у кожи испитиваних група

5.3.5. Имунохистохемијски резултати експресије виментина

Хистолошком анализом на НЕ бојењу запазили смо да дерм фетуса садржи велики број фибробласта и јако мали број фиброцита (сл. 173). Такође смо, у општој хистолошкој анализи, приметили да се број фибробласта у дерму постепено снижава са старењем и да постепено долази до промене односа фибробласти-фиброцити у корист фиброцита, тако да дерм групе најстаријих садржи велику количину међућелијског матрикса у коме су распоређени малобројни фибробласти.



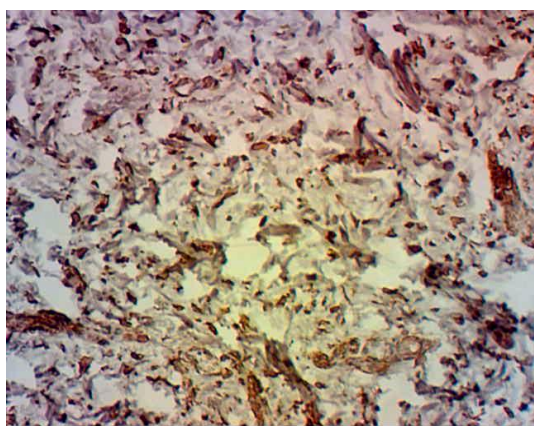
Сл. бр. 173. Бројни фибробласти у дерму коже детета. HE, 10 х, камера 4х.

Имунохистохемијским бојењем на виментин анализирали смо промене у густини и бројности фибробласта у дерму коже. Међутим, пошто виментин не маркира само фибробласте, већ и ендотелне ћелије, глатке мишићне ћелије, лимфоците и ћелије крви, нисмо могли имати до краја реалну процену, већ само индиректан увид и то након умањивања дела имунопозитивних ћелија за утврђени удео учешћа понајпре макрофага, али и осталих побројаних ћелија које се маркирају овим бојењем.

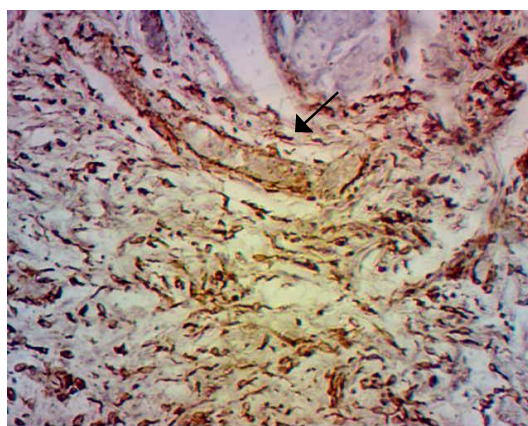
Група новорођенчади и раног животног доба, и на кожи врата и на кожи стомака, показује висок степен имунопозитивности, као и релативног интензитета позитивно обојених ћелија на виментин (сл. 174, 175). Значајније промене у нивоу експресије, у односу на млађи узраст, нисмо регистровали ни у групи средњег животног доба, било да се ради о фотоекспонираној или фотонеекспонираној кожи (сл. 176).

У групи позног животног доба и групи најстаријих, на кожи врата уз нарушену архитектонику дерма, евидентно је смањење броја и густине фибробласта, које кореспондира са смањеном имунохотохемијском позитивношћу ћелија на виментин (сл. 178). Међутим има и појединачних узорака код којих је и даље исказан висок степен имунопозитивности и релативног интензитета позитивно обојених ћелија (сл. 177). У морфогенези и динамичном преуређењу дерма средишњу улогу имају

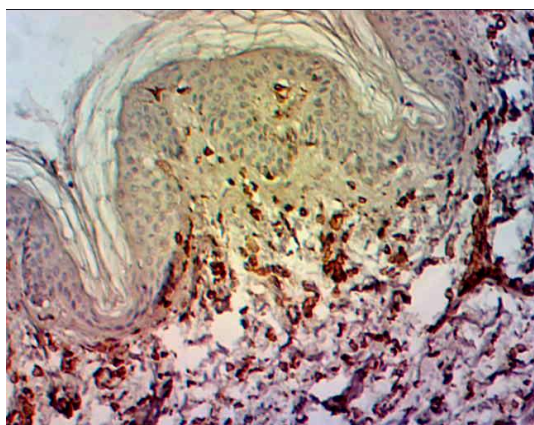
фибробласти. Процес ремоделовања подразумева деструкцијску фазу у којој ћелије разарају ванћелијски матрикс и бластни стадијум у којем синтетишу нове протеине и гликозаминогликане, што управо може и бити узрок ове изражене имунопозитивности. Стекли смо утисак да, кожа стомака, понајвише позног али и најстаријег животног доба, исказује углавном већу имунопозитивност и релативни интензитет позитивно обојених ћелија, у односу на кожу врата, али има и појединачних узорака који исказују смањену имунопозитивност и интензитет бојења на виментин, готово идентичну, као на кожи врата (сл. 179).



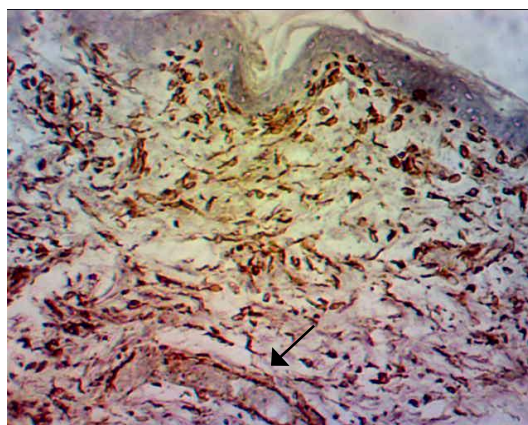
Сл. бр. 174. Имунопозитивност 3, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 3. Новорођенче, виментин, 100 х, камера 4х.



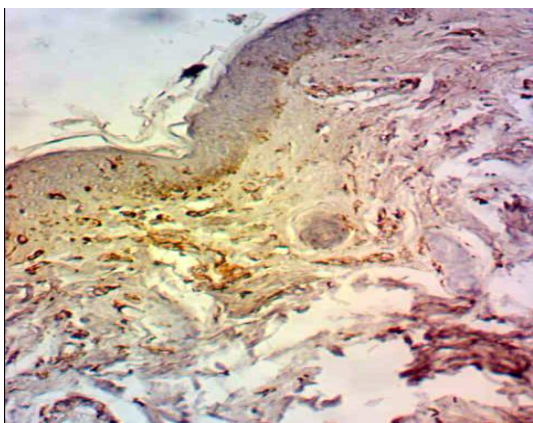
Сл. бр. 175. Имунопозитивност 3, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 3. Дечак, 8 година, кожа врата. Ендотелне ћелије (стрелица). Виментин, 100 х, камера 4х.



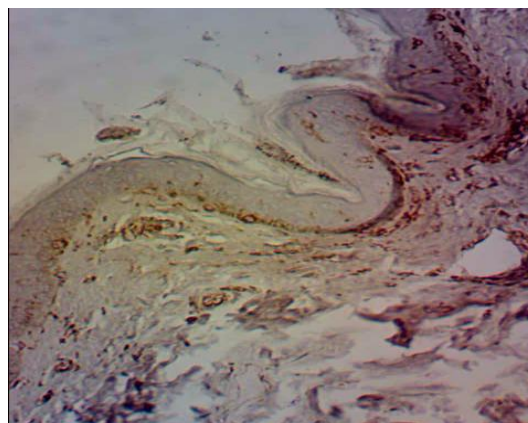
Сл. бр. 176. Имунопозитивност 3, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 3. Младић, 23г, кожа врата. Виментин, 100 х, камера 4х.



Сл. бр. 177. Имунопозитивност 3, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 3. Жена, 49г, кожа врата. Виментин, 100 х, камера 4х.



Сл. бр. 178. Имунопозитивност 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Мушкарац, 63г, кожа врата. Виментин, 40 х, камера 4х.



Сл. бр. 179. Имунопозитивност 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Експресија Виментина највише исказана на граници епидерма и дерма. Жена, 76г, кожа стомака. Виментин, 40 х, камера 4х.

Мерењем степена имунопозитивности и релативног интензитета позитивно обојених ћелија на виментин, установљено је да у кожи врата новорођене деце експресија виментина има скор 2.68 ± 1.41 , а у кожи стомака 2.81 ± 1.18 . Кожа врата раног животног доба има скор експресије виментина од 3.96 ± 1.92 , а кожа врата особа средњег животног доба 2.09 ± 1.76 . Група особа позног животног доба има скор експресије од 1.02 ± 1.07 на кожи врата, док у групи најстаријих та вредност износи 0.96 ± 0.97 . Кожа стомака раног животног доба има скор од 3.88 ± 1.47 . У групи средњег животног доба вредност скорa је 3.64 ± 1.21 , а групи особа старости 41 до 60 година 3.30 ± 1.93 . Најстарији на кожи стомака имају скор експресије од 1.93 ± 0.73 (Табела бр. 17; Графикон бр. 17).

Статистички значајна разлика скорa експресије виментина, између коже врата и коже стомака, у групи новорођене деце и групи раног животног доба није евидентирана, као ни поређењем коже врата и стомака унутар ових двеју група. Статистички значајно мању вредност има кожа врата групе средњег животног доба у односу на групу раног животног доба ($P < 0,05$), док разлика у скору између коже стомака није статистички значајна. Статистички значајно већу вредност скорa има кожа стомака у односу на кожу врата у групи средњег животног доба ($P < 0,01$). Група позног животног доба на кожи врата, има значајно мањи скор у односу на средње животно доба ($P < 0,05$), док се та разлика не евидентира на кожи стомака, а значајно је мања и у односу на кожу стомака унутар саме групе позног животног доба ($P < 0,001$). Статистички значајно мањи скор се региструје у кожи стомака најстаријих, у односу на кожу стомака групе позног животног доба ($P < 0,01$), док статистички значајна

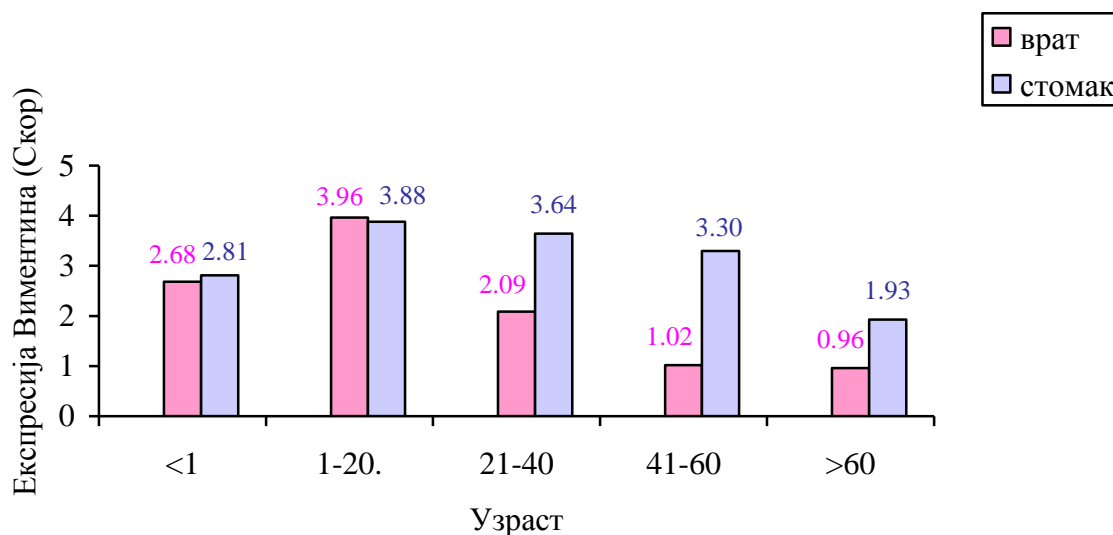
разлика у односу на кожу врата, није евидентирана. У групи најстаријих такође се евидентира статистички значајно већи скор виментина у кожи стомака у односу на кожу врата исте групе ($P<0,01$). Кожа врата најстаријих има значајно нижи скор у односу на кожу врата средњег животног доба ($P<0,05$).

Табела бр.17. Експресија виментина у дерму коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (Скор)			Кожа стомака (Скор)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	2.68	1.41		2.81	1.18
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	3.96	1.92		3.88	1.47
2. група (од 21. до 40г) (средње животно доба)	20	2.09 б**	1.76	**	3.64	1.21
3. група (од 41. до 60г) (позно животно доба)	20	1.02 с*	1.07	***	3.30	1.93
4. група (преко 60г) (најстарије животно доба)	20	0.96 с*	0.97	**	1.93 д**	0.73

* - $P<0,05$; ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$

а - vs новорођенчад, б - vs рано ж.д, с - vs средње ж. д, д- vs позно ж.д.

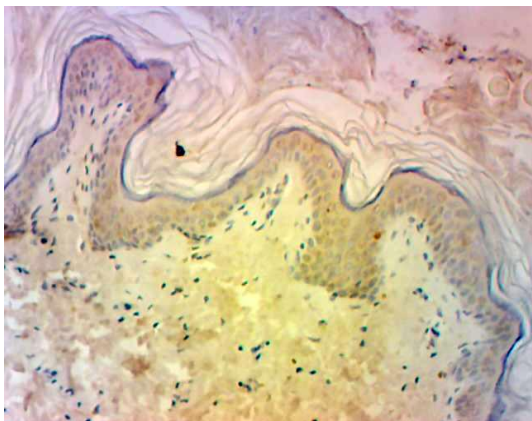


Графикон 17. Експресија виментина у дерму коже у испитиваним групама

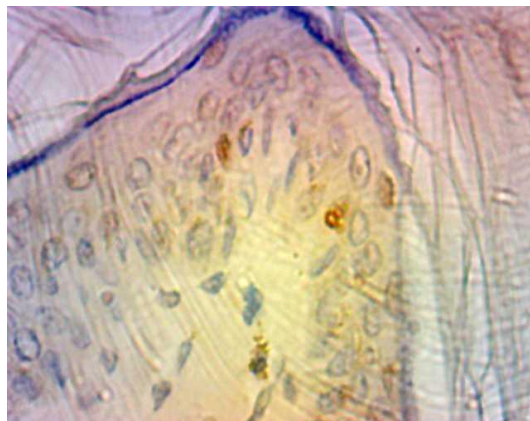
5.3.6. Имунохистохемијски резултати експресије онкопротеина p53

У нормалним ћелијама „дивљи“ тип p53 протеина, који има кратко време живота (6 до 30 минута), налази се у врло малим количинама због сталне разградње и не може се приказати стандардним имунохистохемијским бојењем. Мутирани p53 ген обично кодира стабилнији протеин с продуженим временом живота који се приказује имунохистохемијским бојењем, те се имунохистохемијска анализа изражености p53 сматра корисним показатељем мутација p53. Ниво експресије p53 је оцењен у складу са системом бодовања који оцењује степен позитивности и интензитет бојења. Резултати за позитивност се крећу у распону од 0 до 3 (0 : <1 % 1 : 1 -10 % , 2 : 10-50 % , 3 : >50 % позитивно обојених епидермних ћелија), а за ниво интензитета бојења (релативни интензитет боје позитивно обојених једара од бледо браон -1 до тамно браон -3). Збир ова два резултата узима се као скор за p53 експресију.

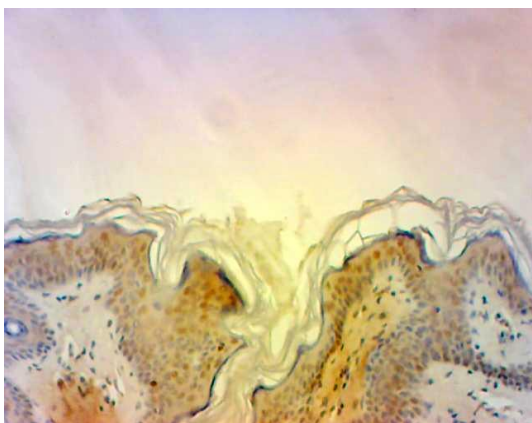
У младој кожи (кожа новорођенчади и раног животног доба) готово и да нема експресије p53 или је она минимална и исказује се у ретким појединачним кератиноцитима (сл. 180, 181). Кожа средњег животног доба и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној регији, исказује експресију p53, са ниским степеном имунопозитивности и релативног интензитета позитивно обојених ћелија, углавном у појединим областима коже и у ретким, појединачним ћелијама спинозног слоја (сл. 182, 183). У кожи врата позног и најстаријег животног доба запажа се различити степен имунопозитивности и релативног интензитета позитивно обојених ћелија, али је он углавном виши у односу на средње животно доба, као и у односу на кожу стомака унутар ових група (сл. 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195). Израчунавањем броја p53 позитивних ћелија по слојевима, установили смо да је садржај ових ћелија у базалном слоју релативно мали, а да највећу количину p53 позитивних ћелија садржи спинозни слој (супрабазално). Повећање ових ћелија у старијем добу и на фотоекспонираној кожи, резултат је повећања њиховог броја у базалном и супрабазалном слоју (сл. 190, 191, 192, 193, 194, 195).



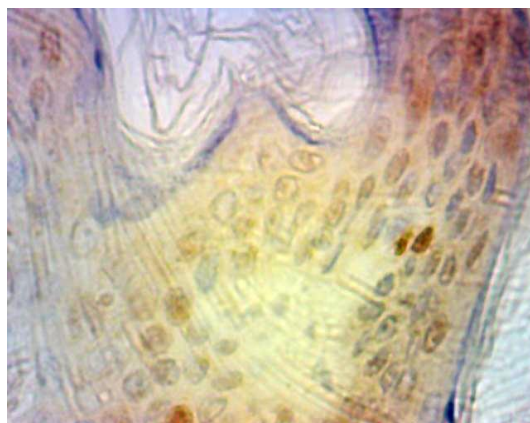
Сл. бр. 180. Негативна експресија p53, степен позитивности 0, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Дечак, 8г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 40 х, камера 4х.



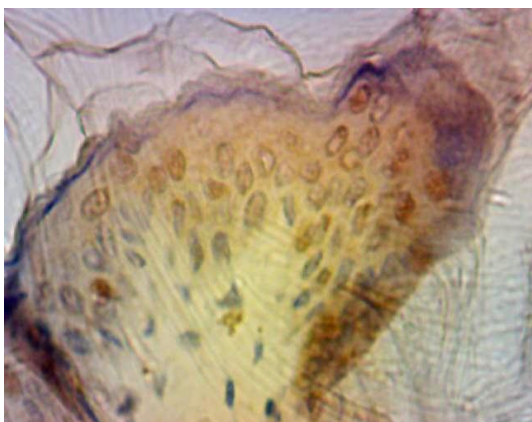
Сл. бр. 181. Негативна експресија p53, степен позитивности 0, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Дечак, 8г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.



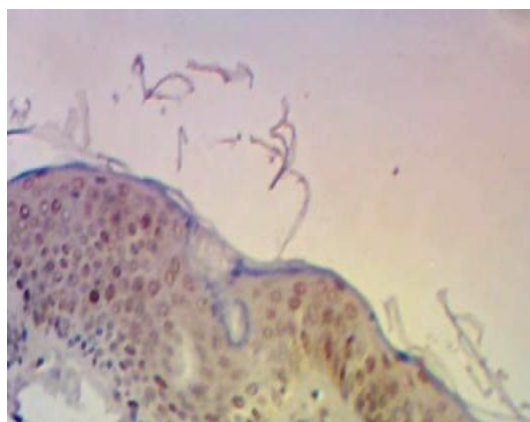
Сл. бр. 182. Умерена имунопозитивна реакција, степен позитивности 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Младић 27г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 40 х, камера 4х.



Сл. бр. 183. Негативна експресија p53, степен позитивности 0, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 1. Младић 27г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.



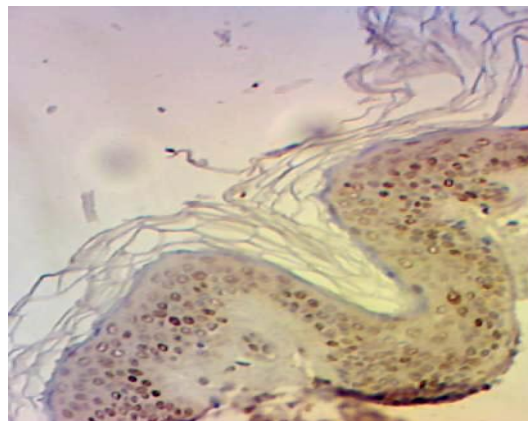
Сл. бр. 184. Степен позитивности на p53 је 2, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Жена 44г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.



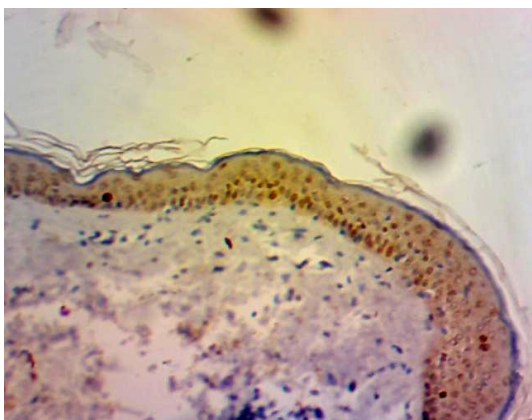
Сл. бр. 185. Степен позитивности на p53 је 2, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Мушкарац, 53г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 40 х, камера 4х.



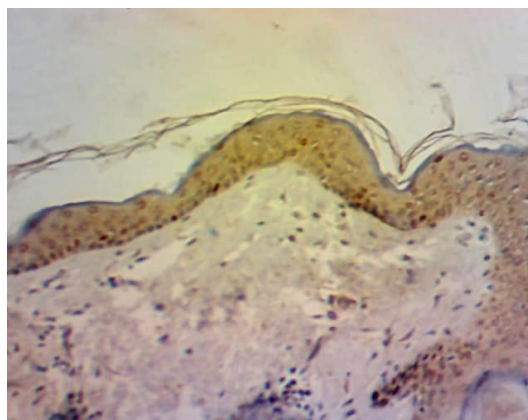
Сл. бр. 186. Степен позитивности на p53 је 2, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Жена, 59 г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 100 х, камера 4х.



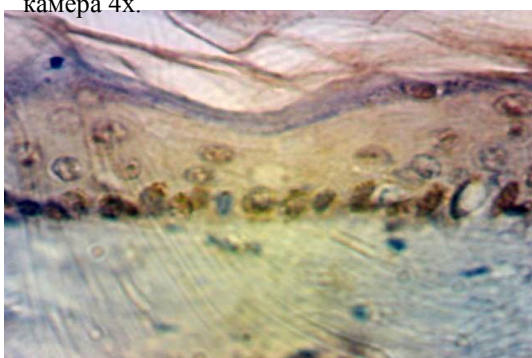
Сл. бр. 187. Степен позитивности на p53 је 2, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Мушкарац, 57 г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 40 х, камера 4х.



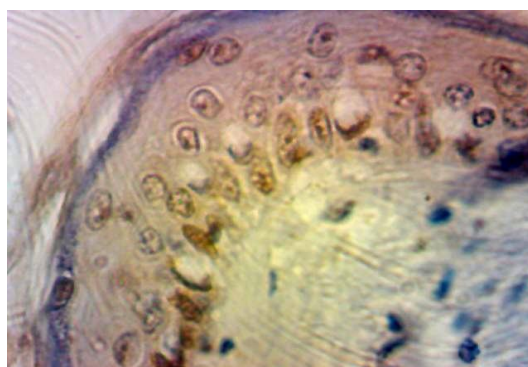
Сл. бр. 188. Умерена имунопозитивна реакција на p53, запажа се углавном у базалном слоју епидерма. Степен позитивности на p53 је 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Жена, 59 г, кожа стомака. Имунохистохемијско бојење на p53, 40 х, камера 4х.



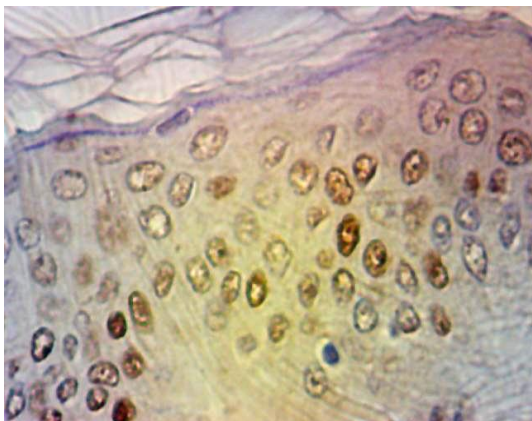
Сл. бр. 189. Степен позитивности на p53 је 1, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 2. Мушкарац, 57 г, кожа стомака. Имунохистохемијско бојење на p53, 40 х, камера 4х.



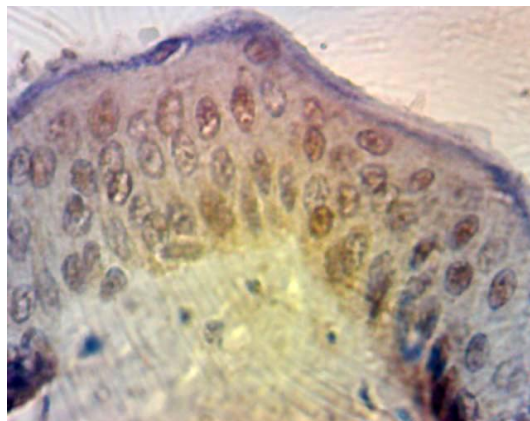
Сл. бр. 190. p53+ ћелије виде се у базалном слоју атрофичног епидерма. Мушкарац, 77г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.



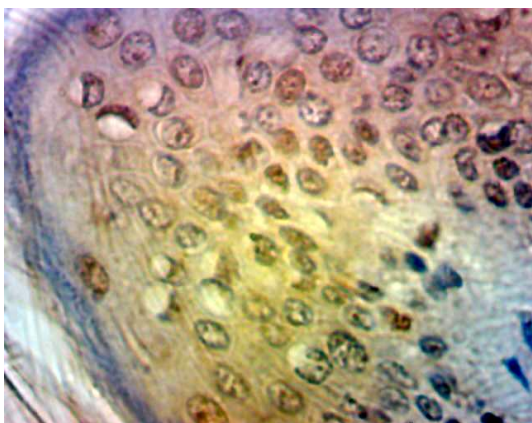
Сл. бр. 191. Изражена имунопозитивна реакција у дискератотичним ћелијама епидерма. Мушкарац, 74г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.



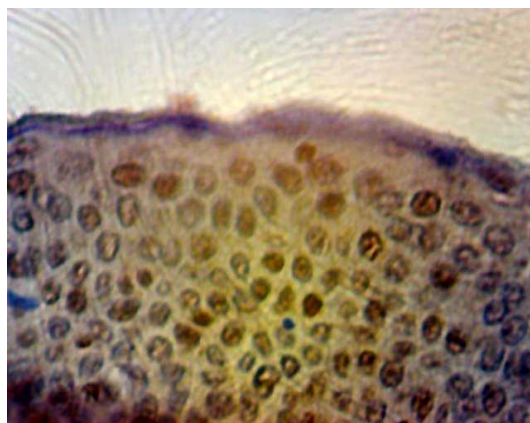
Сл. бр. 192. p53+ ћелије виде се у спинозном слоју епидерма. Мушкарац, 72г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.



Сл. бр. 193. p53+ ћелије виде се у свим слојевима епидерма. Жена, 76г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.



Сл. бр. 194. Изражена имунопозитивна реакција у дискератотичним ћелијама епидерма. Мушкарац, 82г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.



Сл. бр. 195. Експресија p53, у високом степену изражена у свим слојевима кератиноцита. Степен позитивности на p53 је 3, релативни интензитет позитивно обојених ћелија 3. Мушкарац, 82г, кожа врата. Имунохистохемијско бојење на p53, 400 х, камера 4х.

Мерењем степена имунопозитивности и релативног интензитета позитивно обојених ћелија на p53, установљено је да у кожи врата новорођене деце експресија p53 има скор 0.90 ± 0.87 , а у кожи стомака 0.85 ± 0.72 . Кожа врата групе раног животног доба има скор експресије p53 од 1.65 ± 0.78 , а кожа врата особа средњег животног доба 3.65 ± 1.39 . Група особа позног животног доба има скор експресије од 4.56 ± 2.71 на

кожи врата, док у групи најстаријих та вредност износи 5.72 ± 3.18 . Кожа стомака раног животног доба има скор од 1.46 ± 0.63 . У групи средњег животног доба вредност скор је 1.75 ± 1.21 , а групи особа старости од 41 до 60 година 2.09 ± 1.93 . Најстарији на кожи стомака имају скор експресије од 2.36 ± 1.85 (Табела бр. 18, Графикон бр. 18).

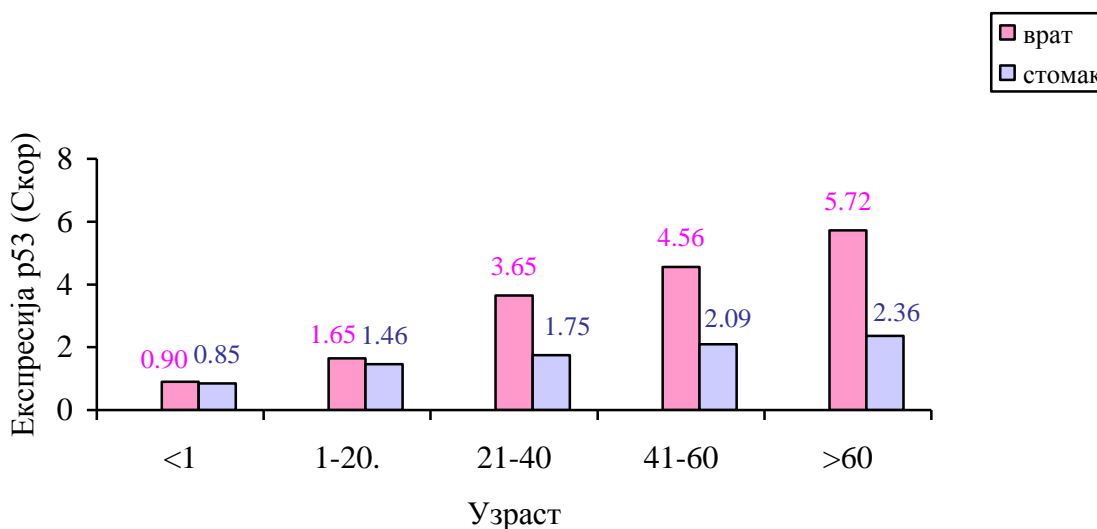
Статистички значајна разлика скор експресије p53 између коже врата и коже стомака, у групи новорођене деце није евидентирана. Статистички значајно већу вредност скор имају и кожа врата и кожа стомака групе раног животног доба у односу на новорођену децу ($P < 0,05$), док унутар сме групе раног животног доба, између коже врата и стомака, та разлика није статистички значајна. Статистички значајно већу вредност има кожа врата групе средњег животног доба у односу на групу раног животног доба ($P < 0,001$), док разлика у скору између коже стомака није статистички значајна. Статистички значајно већу вредност скор има кожа врата у односу на кожу стомака у групи средњег животног доба ($P < 0,001$). Скор p53 групе позног животног доба, ни на кожи врата, ни на кожи стомака, значајно се не разликује ни у односу на средње, ни у односу на најстарије животно доба. Статистички значајно већа вредност скор евидентира се у кожи врата групе позног животног доба, као и групе најстаријих у односу на кожу стомака унутар самих група ($P < 0,01$). Најстарији, на кожи врата имају значајно већи скор у односу на кожу врата средњег животног доба ($P < 0,05$).

Табела бр.18. Експресија протеина p53 у епидермису коже у испитиваним групама

Група	N	Кожа врата (Скор)		врат vs стомак	Кожа стомака (Скор)	
		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
0 група (фет / д. нов)	10	0.90	0.87		0.85	0.72
1. група (од 1. до 20. год) (рано животно доба)	20	1.65 a*	0.78		1.46 a*	0.63
2. група (од 21. до 40г) (средње животно доба)	20	3.65 b***	1.39	***	1.75	1.21
3. група (од 41. до 60г) (позно животно доба)	20	4.56	2.71	**	2.09	1.93
4. група (преко 60г) (најстарије животно доба)	20	5.72 c*	3.18	***	2.36	1.85

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$

a - vs новорођенчад, b - vs рано ж.д, c - vs средње ж. д, d- vs позно ж.д.



Графикон 18. Експресија p53 протеина у епидермису коже у испитиваним групама

6. ДИСКУСИЈА

Старење је природан, временски зависан процес, који карактерише прогресивна појава иреверзибилних промена ћелија, ткива и органа. Са једне стране, механизми старења коже представљени су општим, структурним и функционалним променама целог организма, и грађа коже може одражавати степен старења организма и представљати огледало збивања у унутрашњим органима. Са друге стране, као биолошка баријера, на граници између спољашње и унутрашње средине, кожа је у сталном контакту са спољашњом средином и на њој се могу јавити обележја старења много раније у односу на остале органе (Farage, 2010).

Старење коже је самим тим комплексан биолошки феномен у коме су суперпонирана два типа старења повезана са општим процесом старења, детерминисаног генетским факторима (хронолошко старење) и агресивним дејством фактора спољашње средине, међу којима је најбоље проучено деловање UV зрачења (фотостарење) (Хертель, 2000; Bulteau и сар. 2006).

Са развојем ћелијске биологије, у последњих неколико година, дошло се до става да је упоредо са утврђивањем старости целог организма, некада неопходно

одредити и старост појединих органа, па чак и самих ћелија. У вези са овим проблемом активно се траже параметри који одражавају функционални капацитет ткива, органа или ћелија у одсуству болести, који би били „биомаркери старења“ (Baker и Sprott 1988). Очигледно је да „биомаркери старења“ морају одражавати фундаменталне биолошке процесе и носити информације о функционалном стању неког органа или ткива, метаболичким процесима који се јављају у њима, у корелацији са узрастом (Arking, 1991).

У дерматологији се као „биомаркери старења“ најчешће користе количине колагених и еластичних влакана у папиларном дермису, с обзиром да су мерило комплексних промена основних елемената дермиса и карактеришу његов морфолошки и функционални статус (Uitto и Piekstein, 1998). Међутим, значајан недостатак ових биомаркера је то што не презентују стање епидерма, а само делимично сагледавају промене у дерму. У вези са овим је можда прикладније посматрање ширег обима морфолошких и функционалних параметара коже, узимајући у обзир и карактеристике колагених и еластичних влакана у дермису, али и бројних ћелија које су структурне и функционалне компоненте како дерма, тако и епидерма. Наиме, познато је да су основни фундаментални процеси који детерминишу постојаност структурне и функционалне организације ткива и органа уопште, па самим тим и коже, обнова ћелија, цитодиференцијација и ћелијска смрт (Мяделец и Адаскевич, 2006), а да је координација процеса биосинтезе, метаболизма и ћелијских интеракција у којима учествују различите ћелијске популације епидермиса и дермиса производ деловања различитих регулаторних система у организму, преко формирања локалног неуроимуноендокриног система у кожи (Misery, 1997; Zmijewski и Slominski, 2011).

Због свега овога, следи да је процес старења коже повезан са сложеним међућелијским интеракцијама у кожи, узрокованих анатомским контактима и широким спектром деловања сигналних молекула (Kosmadaki и Gilchrist, 2004; Смирнова и сар. 2005), а усаглашена функција структурних компоненти епидермиса и дермиса, микроокружења, као и функционални ћелијско-матриксни односи, у значајном степену утичу на способност одржавања хомеостазе коже и реаговања на дејство унутрашње и спољашње средине (Farage и сар. 2010). Међутим, иако подједнако важна, динамика узрасних морфолошких промена компоненти епидермиса и дермиса остаје недовољно расветљена (Витрук, 2008) и оставља простор да се свеобухватним приступом у проучавању промена ћелијско-матриксних

односа у кожи при хронолошком и фотостарењу, дође до нових и значајних научних сазнања.

До сада су постојали бројни покушаји да се имунохистохемијским анализама расветли патомеханизам старења коже. У тим студијама детектовани су различити типови и подтипови ћелија, њихови цитокини, хемокини, као и њихов значај у хронолошком и фотостарењу, али углавном селективно. У вези са тим чињеницама, циљ нашег истраживања био је да се откривањем нових научних истина о узрасним променама коже на фотоекспонираним и фотонеекспонираним регијама, и учешћу ћелијских и ванћелијских компоненти епидермиса и дермиса у том процесу, да свеобухватнија слика о старењу коже. Иако класичне хистолошке методе за неке морфолошке карактеристике представљају „златни стандард“, оне имају недостатак, који се огледа у немогућности сагледавања динамике промена током старења. Ипак, ове технике могу пружити увид у дистрибуцију, бројчану и процентуалну заступљеност појединих типова ћелија, као и у распоред и густину структурних елемената ЕЦМ-а попут колагених и еластичних влакана.

Познавање дебљине епидерма коже је од великог значаја за многе области медицине. Да би се разумеле реакције коже на биохемијске или биофизичке стимулусе неопходно је познавање дебљине епидерма, у зависности од фактора као што су старост, пол и анатомска локализација (Laurent и сар. 2007). Ми смо у нашем истраживању након квалитативне хистолошке анализе и општег увида у хистоархитектонику фотоекспониране и фотонеекспониране коже испитиваних група, проценили да постоји основа за квантитативну анализу дебљине слојева коже. За хистолошку анализу структуре епидерма користили смо узорке бојене НЕ техником бојења, а на истим узорцима смо и морфометријским мерењем, у програму *Image J*, одредили дебљину вијабилног епидерма.

Резултати наше хистолошке и морфометријске студије показују да динамика промена дебљине вијабилног епидерма, у функцији времена (старења), има сличан тренд на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Кожа врата, као и кожа стомака, након првог повећања дебљине епитела у раном животном добу, задебљава и у средњем животном добу, а потом се значајно смањује у корелацији са старењем. Са старењем, епидерм постаје значајно тањи, како на кожи врата, тако и на кожи стомака, пре свега због повлачења епидермних пречки. Такође смо уочили и да фотоекспонирана кожа старијих од 40 година има значајно тањи епидермис, у односу

на фотонеекспонирану кожу истог животног доба, што би значило да је процес атрофије епидермиса израженији на кожи која је стално изложена Сунцу.

Већина истраживача је сагласна да је стањивање епидермиса примарно изазвано повлачењем епидермних пречки из дермиса, што доводи до заравњавања додирне површине између епидермиса и дермиса. Једна од последица је то, да епидермис старе коже постаје мање отпоран на повреде и лакше се кида приликом траума. Истраживањем механизма зарастања повреда коже, особа различитог животног доба, откривено је да се *turnover* кератиноцита одвија два пута спорије код особа од треће до седме декаде живота (Enoch и сар. 2004). Резултати неких студија показују да су успорен опоравак и репарација епидерма последица успоравања процеса епидермопозе. Испитивањем старења кератиноцита откривено је да смањење митоза кератиноцита почиње после треће декаде живота (Richter и сар. 2004). Ово потврђује и наше истраживање, јер смо и ми запазили прве промене структуре епидермиса, карактеристичне за процес старења, у групи особа старости од 41-60 година, дакле након треће декаде. У групи позног животног доба, као и групи најстаријих (преко 60 година старости), регресивни процеси се јасно одражавају на квалитативне и квантитативне карактеристике епидермиса и на фотоекспонираној, и на фотонеекспонираној кожи. Епидермис је значајно тањи због смањења броја ћелија у сваком од слојева, што је посебно наглашено у спинозном слоју. То је последица снажно редуковане митотске сепарације (чији су први продукт спинозне ћелије) и смањењеног *turnover*-а кератиноцита (што резултује умањењем њихове виталности и волумена)(Bailey, 2001).

Резултате сличне нашим презентовала је група француских истраживача, која је проучавала дебљину епидермиса и дермиса, у зависности од старости. Резултати студије морфометријске анализе хистолошких пресека, *punch* биоптата коже 64 здрава добровољаца, старости од 20 до 80 година (5 особа на сваких 10 година) показали су да са старењем долази до прогресивног (6,4% по деценији) стањивања епидермиса, које почиње већ око тридесете године живота (Branchet и сар. 1990).

Студије које анализирају дебљину епидермиса неретко показују неусаглашене резултате у динамици промена, током хронолошког старења, што се делом може повезати са различитом узрасном периодизацијом посматраних група.

У дисертацији Загорученко (1973), рађеној на аутопсијском материјалу особа мушког пола, узраста од неколико дана до 82 године, коже капилцијума, утврђено је да је вијабилни епидермис најтањи у кожи новорођенчади, потом задебљава до 25.

године, а после 50-те године се тањи. Истраживање Смирнова-е (2004), о промени дебљине епидерма слепоочне области коже жена, у узрасној корелацији, показује тенденцију стањивања епитела после 19. године. Горелова (2010) је морфометријским мерењем епидерма проучаваних узорака коже показала да од рођења па до 20. године епидермис задебљава, у узрасту од 25. до 45. године остаје приближно исти, а потом се постепено његова дебљина смањује. Ми смо можда најближи овом резултату, јер смо утврдили да епител и на кожи врата и на кожи стомака задебљава у периоду раног животног доба, своју највећу вредност достиже у групи старости од 21 до 40 година (просечна старост $33,1 \pm 4.95$ година) и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Потом се, и на кожи врата, и на кожи стомака истраживаних узорака, старијих од 40 година, његова дебљина значајно смањује. Треба напоменути да је наша група средњег животног доба прилично нехомогена, а чине је особе оба пола, чиме се може делимично објаснити највиша вредност у овој групи, а не групи раног животног доба (просечна старост 9.95 ± 5.92 година) како презентују наведена истраживања. Запажање, слично нашем, имали су и Yaar и Gilcrest (2003) и Gilhar и сар. (2004) који су показали да се епидермална дебљина смањује код старих у поређењу са младима, као и да старење коже почиње са 40 година.

Резултате сличне нашим недавно су публиковали Abd El-Aal и сар. (2012). Они су анализирали дебљине епидермиса две старосне групе: двадесет двоје људи, старости од 48 до 75 година, за групу старих и петнаесторо младих, старости од 18 до 28 година. Бојена је и анализирана фотозаштићена кожа леђа. Ова студија је показала да се епидермална дебљина у групи старих ($21.81 \pm 5.4 \mu\text{m}$), сигнификантно смањила, у поређењу са групом младих ($39.84 \pm 7.4 \mu\text{m}$), током старења. Слично саопштење публиковали су Al-Nabib и Kadhim (2012) који су у морфометријској анализи дебљине епидермиса коже стомака утврдили да је епидермис најдебљи у групи од 1-9 година, $69.39 \pm 2.85 \mu\text{m}$, да задржава приближну дебљину у групи 12-30 година, $67.78 \pm 3.07 \mu\text{m}$, а потом му се дебљина значајно смањује са старењем, па у групи особа старости преко 40 година има вредност $46.49 \pm 2.37 \mu\text{m}$. Ове вредности су сличне нашим вредностима дебљине вијабилног епидерма, измереним на кожи стомака, које за рано животно доба износе $56.07 \pm 11.44 \mu\text{m}$, средње животно доба $66.31 \pm 12.02 \mu\text{m}$, позно $57.22 \pm 14.62 \mu\text{m}$, са даљим трендом смањења у групи старијих од 60 година, где је вредност $42.18 \pm 9.11 \mu\text{m}$.

Нешто раније Kakasheva-Mazhenkovska и сар. (2011) су анализирали и поредили дебљину епидермиса коже капилицијума у пет узрасних група: група млађих од годину дана, деца од 1 до 12 година, група адолесцената (13-22 године), група одраслих (23-55 година) и група најстаријих (56-73 године). Саопштено је да група млађих од годину дана има најтањи епидермис, од просечно 40.1 μm , група деце до 12 година, нешто дебљи - 44.9 μm , група адолесцената, најдебљи - 85.3 μm , одрасли 77.1 μm и најстарији 53.8 μm . Вредности добијених резултата, као и динамика промена дебљине вијабилног епитела, у сагласности су са нашим резултатима, са неким делимичним одступањима која су условљена различитом узрасном расподелом, као и различитим регијама анализиране коже.

Бројни аутори наводе да се атрофија коже, једна од најзначајнијих карактеристика и физиолошког и фотостарења, карактерише атрофијом епитела (Baumann, 2009; Yaar и Gilchrest, 2007; Kawada, 2011) и губитком целуларних компоненти епидермиса и дермиса (Gilchrest, 1984; Lavker и сар. 1995). Атрофија ћелије је појам којим се описује смањење величине ћелије, услед смањене синтезе и/или повећане разградње органела. Настаје као последица поремећаја исхрањености или функционалних испада. Атрофија ткива или органа настаје када је процесом захваћен довољан број ћелија (Kumar и сар. 2010). Најчешће се истиче да је хроностарење коже повезано са снижењем пролиферативне активности кератиноцита, услед њихове смањене осетљивости на факторе раста (Goldsmith и сар. 2012). Има и саопштења да током старења долази до повећања резистентности кератиноцита на апоптозу (Швецова, 2009). Ово може бити резултат блокаде p53 другим протеинима, пре свега ендогеним bcl-2 и MDM-2 протеином (engl. murine double minute 2 protein) (Zhao и сар. 2013) или мутацијом гена и образовањем мутираног типа протеина mt p53 (Bowen и сар. 2003). Треба истаћи да се и код глодара, гајених у лабораторији, епидермис са старењем такође истањује из чега би се можда могло закључити да је узрасна промена дебљине епидермиса општа биолошка законитост или правило, а не само специфичност везана за људску кожу (Горелова, 2010).

Појава атрофије епитела везује се и за деловање UVB зрака на кожу, док UVA зраци изазивају највећи степен патохистолошких промена у дерму (Contet-Audonneau и сар. 1999; Pinnell, 2003; Arenson и сар. 2009). Атрофија је индукована понављањем, хроничном експозицијом UV зрачења које има кумулативни ефекат (Lavker, 1979; Bissett и сар. 1987; Lavker и сар. 1995; Papel, 2002; Matsumura и Ananthaswamy, 2004; Matts и Fink, 2010). Наши резултати су у сагласности са до сада објављеним

саопштењима, да на фотоекспонираној кожи долази до атрофије епидермиса, у корелацији са старењем. Наиме, са годинама на фотоекспонираној кожи долази до смањења дебљине епидермиса и заравњења епидермо-дермне границе. Највероватнији узрок је губитак дермних папила и заравњење епидермних гребена (Contet-Audonneau и сар. 1999). Како се основни механизам деловања UV зрака заснива на продукцији и накупљању реактивних врста кисеоника (ROS), који у случају хроничне експозиције доводе до исцрпљивања антиоксидативних заштитних механизма ћелије и индукују појаву оксидационог стреса (Yasui и сар. 2000; Courdavault и сар. 2004; Pfeifer и сар. 2005; Cadet и сар. 2005; Cadet и сар. 2009; Cadet и Douki, 2011), присуство атрофије епидермиса, у фотоекспонираној кожи старијих од 40 година, можемо објаснити масивним оксидативним оштећењима кератиноцита и индукцијом апоптозе ћелија. Апоптоза ћелија у физиолошким условима представља механизам баланса између стопе пролиферације ћелија и дебљине епитела (Tomas, 2009), док се сам процес кератинизације може сматрати специјализованим типом програмиране ћелијске смрти (Lippens и сар. 2009). Хистолошки, апоптоза се карактерише кариопикнозом, еозинифилијом цитоплазме и фрагментацијом ћелије, али је доказано да масивна апоптоза, због тога што не изазива запаљенску реакцију и имунолошки одговор ткива у коме се одвија, углавном није видљива на хистолошким препаратима (Kumar и сар. 2010).

Ова запажања нису сагласна са запажањима El-Domyati и сар. (2002), који истичу да се епидермална дебљина не мења кроз деценије, било да се ради о фотоекспонираној или фотонеекспонираној кожи. Yaar и Gilchrist (2003) саопштавају да је дебљина епидерма ирегуларна и индивидуална за кожные типове III, IV и V на фотоекспонираној кожи. Употребом конфокалне микроскопије, насупрот резултатима које су добили Gniadecka и Jemec (1998), Robertson и Rees (2010) нису нашли да је дебљина епидерма зависна од анатомског подручја, нити да постоји разлика у дебљини између покривених и откривених делова тела. Ове разлике су објашњене различитим техникама које се користе за мерење структуре коже, уз сугестију да се настави потрага за оптималним методама мерења.

Нешто раније, такође употребом конфокалне микроскопије, уз анализу сваког појединачног слоја, Neerken и сар. (2004) су спровели морфометријску анализу епидермиса и папиларног дермиса, поредећи кожу особа старости 19-24 године, са особама старости 54-57 година. Мерена је дебљина корнеалног слоја, минимална и максимална дебљина епидермиса, дебљина дермно-епидермног споја и дебљина

папиларног дермиса. Утврђено је да се са старењем умањује дебљина дермно-епидермног слоја и дебљина папиларног дермиса, а да у осталим слојевима, рачунајући и епидермис, нема значајних промена дебљине.

Такође је показано да кератиноцити оних регија коже које су изложене хроничној инсолацији карактерише висока пролиферативна активност, али и већа осетљивост на деловање билошких фактора (Goldsmith и сар. 2012). Неке студије истичу да су варијабилна дебљина, са наизменичним подручјима изражене атрофије и хиперплазије и високим степеном нуклеарне атипичности у кератиноцитима, последица дисрегулације раста кератиноцита, изложених UV зрачењу (El-Abaseri и сар. 2006; Yaar и Gilchrist, 2007). И ми смо у нашем истраживању уочили узорке фотоекспониране коже који су имали наизменична подручја изражене атрофије и хиперплазије са сликом тзв. архитектонског хаоса. Иако узроци пораста дисрегулације кератиноцита нису добро тумачени, сматра се да цитокини које секретују кератиноцити могу бити укључени у овај процес. Активни промотери раста кератиноцита су IL-1, IL-6, IL-8, гранулоцитно-макрофагно стимулишући фактор раста колонија (GM-CSF), трансформишући фактор раста-алфа (TGF- α), амфирегулин и нервни фактор раста (NGF) (engl. Nerve growth factor). Такође и цитокини које секретују фибробласти, као што су кератиноцитни фактор раста (KGF) (engl. Keratinocyte growth factor), епителни фактор раста (EGF) (engl. Epidermal growth factor), и хепатоцитни фактор раста (HGF) (engl. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) стимулишу раст кератиноцита (Helbig и Paasch, 2011).

Излагање коже UV зрачењу стимулише кератиноците да отпуштају цитокине, интерлеукин-1 (IL-1) и фактор некрозе тумора-алфа (TNF- α) који су потенцијални медијатори инфламације, а имају и имуномодулацијску функцију (Helbig и Paasch, 2011). Интерлеукин-1 може имати неколико значајних улога у еритему изазваном UVB зрачењем: у хемотаксији леукоцита, индукцији адхезивних молекула, попут ендотелног леукоцитног адхезивног молекула-1 (ELAM-1), интерцелуларног адхезивног молекула-1 (ICAM-1) и васкуларног ћелијског адхезивног молекула-1 (VCAM-1), а такође и у стимулацији пролиферације кератиноцита и производње простагландина E2, IL-1 и IL-6 (Norris и сар. 1993).

Излагање UVB зрачењу изазива подизање нивоа IL-6, фактора који отпуштају кератиноцити, директно или под дејством IL-1. Познато је да IL-6 има неколико важних улога у процесу инфламације. Претпоставља се да изазива хемотаксу Т-ћелија и врши активацију и стимулисање цитотоксичних Т-ћелија. Такође је нађено, да

експозиција UVB зрачењу доводи до повишења нивоа TGF, за који се предпоставља да има улогу у пролиферацији кератиноцита, хиперплазији епидерма и ангиогенези (Hawk, 1992).

Саопштено је да мастоцити и инфламаторне ћелије које су укључене у изражену продукцију цитокина могу утицати на патологију промена у фотооштећеној кожи. Показано је да UV радијација повећава већину од ових цитокина. Такође и механизми репарације зависе од цитокина и цитокинско-рецепторских интеракција. Једна студија је демонстрирала повећање динамичке равнотеже mRNA за IL-1 α , TNF- α и TGF- β у кожи бездлаких мишева изложених UVB зрачењу, сугеришући да су ови цитокини укључени у промене у фотооштећеној кожи (Schwartz и сар. 1998). Zhou и сар. (1996) и Kondo и сар. (1999) су показали да после UVB зрачења долази до смањења експресије рецептора за кератиноцитни фактор раста KGF-R (engl. Keratinocyte growth factor receptor) и хемокинског рецептора CXCR-2 (engl. Chemokine receptor) у хуманим кератиноцитима. Пошто CXCR-2 везује IL-8 и MGSA/Gro α (engl. Melanoma growth stimulatory activity/gro α), а оба имају промотивну активности на епидермалне кератиноците, снижење рецептора, деловањем UVB зрачења, може смањити способност одговора епидермиса на пораст дермалне синтезе KGF и епидермалне хиперпродукције IL-8 и Gro α . Смањење експресије цитокинских рецептора може у значајном степену утицати на контролу раста кератиноцита (Kondo, 2000).

Очигледно је да не постоји усаглашеност ставова у вези динамике промена дебљине епидермиса, како на фотоекспонираној, тако и на фотонеекспонираној кожи. Презентовани резултати, који се разликују од студије до студије, тешко се могу објаснити. Ова неусаглашеност се само условно може приписати разлици у деловима коже који су испитивани, као и примени различите методологије у истраживањима (конфокална микроскопија нпр.). Да би истраживачи дошли до сагласности о овој теми, за будућа истраживања би било важно да се фокусирају на стандардизоване делове коже, уз усаглашену узрасну периодизацију, како би лакше могли да пореде своје резултате.

Корнеални слој представља „мртви део епидерма“, који има заштитну улогу и који представља седиште баријерне функције коже (Lalević-Vasić и сар. 2008). За хистолошку анализу структуре корнеалног слоја користили смо узорке бојене HE техником бојења, а на истим узорцима смо и морфометријским мерењем, у програму

Image J, одредили дебљину корнеалног слоја. У хистолошкој анализи смо пратили структуру корнеалног слоја и број слојева корнеоцита.

Растресита, уплетена форма (engl. Basketweave) представља нормалну структуру корнеалног слоја (Elias, 2012). Ми смо у нашем истраживању уочили да кожа фетуса и новорођене деце има корнеални слој израђен од 7 до 8 редова корнеоцита, да младе особе, групе раног животног доба, имају нешто дебљи корнеални слој на кожи врата у односу на кожу стомака, са већим бројем редова корнеоцита, растресите, уплетене форме. Кожа врата средњег животног доба на једном броју узорака показује хиперкератозу растреситог типа са великим бројем редова корнеоцита (најчешће, 15-17), која је израженија у односу на кожу стомака, а и у односу на групу раног животног доба. Највећи број редова корнеоцита види се на кожи врата групе позног животног доба (најчешће, 16-20), растресите форме. Група најстаријих на кожи врата има углавном компактну форму корнеалног слоја, и на узорцима са хиперкератозом и на узорцима који имају нормалан корнеални слој са мањим бројем редова корнеоцита.

Морфометријским мерењем смо установили да динамика промена дебљине корнеалног слоја у функцији времена тече истим током и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Корнеални слој је најтањи у групи фетуса и новорођене деце, задебљава у групи раног животног доба, а максималну дебљину достиже у позном животног добу. Након тога има тренд опадања и најмању вредност у најстаријем животног добу. Статистички значајне разлике у дебљини корнеалног слоја евидентирају се у групи средњег, позног и најстаријег животног доба, са дебљим корнеалним слојем на фотоекспонираној кожи, што би могло да значи да хронично излагање деловању Сунчеве радијације узрокује израженије задебљање *Stratum corneum*-а.

Наши резултати се подударају са ставовима истраживача (Pearse и сар. 1987; Bissett и сар. 1987; Lavker и сар. 1995; Kambayashi и сар. 2001; Matsumura и Ananthaswamy, 2004) који наводе да различите дозе UV зрака доводе до појаве повећања броја слојева у корнеалном слоју и његовог задебљања. Резултат наше студије, у коме је највећа вредност забележена у позном животног добу, на кожи врата, потврђује да је један од најзначајнијих механизма којима се кожа брани од утицаја UV зрачења, управо задебљање корнеалног слоја. Наиме, ово животно доба повезано је са радном активношћу и већом изложеношћу инсолацији у односу на старије од 60 година. Заштита од оптичког зрачења кроз еволуцију човека развила се

доста сврсисходно. Задебљање корнеалног слоја је други заштитни фактор коже од штетног дејства UV зрака. После еритема коже изазваног UV зрачењем, јавља се тамњење (повећање садржаја меланина) и задебљање корнеалног слоја, што штити кожу од поновне појаве еритема. Делови коже који имају задебљали *Stratum corneum*, као што су дланови и табани, далеко су мање осетљиви на UV зрачење (Goldsmith, 2012).

El-Domyati и сарадници су у истраживању које је обухватило 83 здрава добровољаца, старости 6-84 године, којима су узимани биоптати коже са фотоекспонираних и фотозаштићених регија тела, показали да се дебљина корнеалног слоја не смањује, чак ни са старењем, а да је повећана на фотоекспонираним регијама коже (El-Domyati и сар. 2002), што се делимично не слаже са нашим резултатом. Ми смо уочили да је дебљина корнеалног слоја повећана на фотоекспонираној кожи, али и да се смањује са старењем и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Разлике се вероватно последица утицаја климатских специфичности (већа хронична инсолација код њихових узорака), као и различитих фототипова коже који су истраживани. Наиме, ми смо истраживали узорке коже који најчешће припадају типу II и III по Fitzpatrick-у, док се њихово истраживање односило на кожу која припада типу IV и V.

Најчешће дејство UV зрака на кожу огледа се у задебљању корнеалног слоја, које прати и растући број ћелија у гранулозном слоју (Seité и сар. 1998; Savić, 2011). У случајевима убрзане пролиферације постоји обрнута веза између присуства и дебљине гранулозног слоја и паракератозе (Lever, 2005; Kumar и сар. 2010; Gambichler и сар. 2011), коју ми нисмо регистровали на нашим узорцима. Мишљења смо да су убрзана диференцијација и транзиција ћелија кроз епител, узроковане оксидативним оштећењима (Stan и сар. 2004; Lever, 2005; Marmur и Amir, 2007; Kumar и сар. 2010), довеле до хиперкератозе исказане на фотоекспонираним регијама у групи позног и најстаријег животног доба. Опште је прихваћено да светлост индукује епидермопоезу умножавањем ћелија спинозног слоја (акантоза) и задебљањем корнеалног слоја (хиперкератоза). Рожаста слој, као прва кожна баријера, може зраке да рефлектује, ослаби расипањем и неутралише апсорпцијом користећи њихову енергију за превођење неких киселина из *trans*- у *cis*-форму. Показано је да ако се кожа излаже суберитемским дозама зрачења, за две до три седмице постигне се задебљање епидерма које није могуће повећати појачањем дозе (Dostanić и сар. 2000). Задебљање корнеалног слоја зависи од таласне дужине зрака.

Ако се узме да нормалан епидерм садржи око 12 слојева ћелија у корнеалном слоју, после експозиције UVA зрацима овај број се повећава на око 14 слојева, а после излагања UVB зрацима на 19 (Dostanić и сар. 2000). Хиперкератоза је заштитни механизам коже на дејство UV зрачења, при чему се повећањем броја редова корнеалног слоја повећава дебљина епитела, а самим тим и број слојева ћелија кроз које пролазе UV зраци. На овај начин њихови фотони реагују са већим бројем кератиноцита губећи своју енергију тако да мања количина енергије доспева до дубљих слојева коже, штитећи је од оштећења. Термином хиперкератоза означава се хиперплазија ћелија корнеалног слоја коже (Lalević- Vasić, 2003).

Резултате сличне нашим презентовале су и друге студије. Истраживање дебљине корнеалног слоја, са одређивањем броја редова корнеоцита, било је спроведено од стране јапанских научника 1999. године, коришћењем технике замрзавања хистолошких пресека. Истраживањем је био обухваћен 301 добровољац, а анализирано је 26 топографских локација на кожи. Минимална количина слојева је утврђена на кожи гениталија (6 ± 2) и лица (7 ± 2 до 10 ± 3) и иако није нађена значајна веза између броја слојева корнеоцита и пола, регистровани су умерено повећање броја слојева корнеоцита у кожи образа и леђа мушкараца, у корелацији са старењем (Ya-Xian и сар. 1999).

Најобимнија студија је спроведена на одраслим Корејанцима у истраживању које је обухватило 452 узорка, са 28 топографских зона коже. Саопштено је да се дебљина корнеалног слоја коже значајно разликује у односу на расу, старосно доба, пол и топографску локализацију (Lee и Hwang 2002).

Резултате сличне нашим недавно су публиковали Kakasheva-Mazhenkovska и сар. (2011) који су анализирали и поредили дебљину епидермиса коже капилицијума и саопштили да група млађих од годину дана има корнеални слој дебео $120.7\text{ }\mu\text{m}$, група деце до 12 година, $53.4\text{ }\mu\text{m}$, група адолесцената, $73.4\text{ }\mu\text{m}$, одрасли, $97.5\text{ }\mu\text{m}$ и најстарији, $58.2\text{ }\mu\text{m}$. Ова динамика промене дебљине корнеалног слоја подудара се са нашим истраживањем, са неусаглашеношћу за групу млађих од годину дана. Наиме, кожа капилицијума у том узрасту има дебљи корнеални слој, који има 4 до 5 пута бржу десквamacију корнеоцита, у односу на друге регије коже (Farage, 2010).

На Универзитету у Единбургу током 2010. године мерена је конфокалном микроскопијом, уз помоћ Vivascope 1500 програма, дебљина корнеалног и грануларног слоја, укупна дебљина епидерма и дужина дермних папила, на кожи 10

анатомских области. Утврђено је да дебљине корнеалног и гранулозног слоја, као и дужина папила зависе пре свега од топографске регије коже (Robertson и Rees, 2010).

Има аутора који истичу да се број корнеоцита не мења са годинама тако да *Stratum corneum* задржава своју нормалну дебљину од приближно 14-17 слојева. Једно од првих истраживања које се бавило мерењем дебљине корнеалног слоја презентовали су Holbrook и Odland (1974). Ови истраживачи су мерили дебљину корнеалног слоја на четири локације танке коже и утврдили да се дебљина налазила у распону од 7.7 до 13 μm , а број слојева од 14 до 23. У нашем истраживању је утврђено да се број слојева корнеоцита у корнеалном слоју одраслих креће у распону од 12 до 20, као и да су вредности дебљине корнеалног слоја знатно више од презентованих вредности у овом истраживању, што се може објаснити различитим регијама истраживане коже, као и различитом методологијом мерења.

Ултразвук и микроскопске студије, фокусиране специфично на промене дебљине корнеалног слоја током старења, показују занемарљиве или никакве промене у овом слоју чак до 97. године живота. Међутим, треба напоменути да постоје значајне варијације у дебљини корнеалног слоја између појединаца, као и између различитих регија коже сваког појединца (Farage, 2010) што смо и ми уочили у нашем истраживању.

Sandby-Moller и сар. (2003) су користећи технику *punch* биопсије мерили дебљину епидермиса на 3 анатомске локализације коже 71 волонтера. Студија је разматрала факторе као што су пол, старост, васкуларизација, ниво пигментације, тип коже и пушење. Утврђено је да је просечна дебљина корнеалног слија подлактице 18.3 μm , рамена - 11 μm , задњице - 14.9 μm . Дебљина епидерма у тим регијама била је 56.6 μm , 70.3 μm и 81.5 μm .

Попут дебљине епидермиса очигледно је да не постоји усаглашеност ставова у вези узрасне динамике промена дебљине корнеалног слоја, како на фотоекспонираној, тако и на фотонеекспонираној кожи. Ставови нису усаглашени ни по питању узајамног односа фотоекспониране и фотонеекспониране коже. И у овом случају неусаглашеност резултата и ставова се само условно може приписати разлици у деловима коже који су испитивани, као и примени различите методологије истраживања. Да би истраживачи дошли до сагласности о овој теми важно је да фокус истраживања буде на стандардизованим деловима коже, уз усаглашену узрасну периодизацију, као и да се истраживање спроведе на што већем узорку. На тај начин би и поређење резултата било сигурно много лакше.

Идентично, као и у случају епидермиса, познавање дебљине дермиса је од великог значаја за многе области медицине (Laurent и сар. 2007). Ми смо у нашем истраживању дебљину дерма одређивали употребом *Image J* програма на препаратима бојеним *HE* техником. Најмању дебљину дерма има кожа фетуса/новорођенчади и на врату и на стомаку. Приметили смо да дебљина дерма има тенденцију повећавања у групи 1-20 година. Група средњег животног доба има даље повећање дебљине дерма и њена вредност на врату износи $1965.71 \pm 193.12 \mu\text{m}$, а на стомаку $1632.43 \pm 208.14 \mu\text{m}$. У позном животног доба дебљина дерма коже врата је тања и износи $1828.34 \pm 166.91 \mu\text{m}$, као и стомака где износи $1456.21 \pm 196.27 \mu\text{m}$. Даљи тренд опадања дебљине дерма је и у групи најстаријих где на кожи врата има вредност $1535.15 \pm 188.72 \mu\text{m}$, а на кожи стомака $1238.62 \pm 178.47 \mu\text{m}$.

Динамика узрасних промена дебљине дерма иста је и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи, а разлике се евидентирају у оквиру средњег, позног и најстаријег животног доба у односу на фотоекспонираност. Наиме, фотоекспонирана кожа у овим узрасним групама има значајно дебљи дерм у односу на фотонеекспонирану кожу.

Мишљења смо да је тенденција смањења дебљине дерма након 40-те године повезана са интензивним процесима синтезе који се бележе до тог доба, а затим дегенерацијом екстрацелуларног матрикса који евидентирају и други истраживачи (Takema и сар. 1994; На и сар. 2005; Dumas и сар. 2005). Стањење коже са старењем је последица смањења дермалне синтезе колагена (Farage и сар. 2010). Студије су показале да се на фотоекспонираној кожи повећава ниво гликозаминогликана и протеогликана у ретикуларном дермису, док се количина колагених влакана смањује (Affinito и сар. 1999), па је интринзичко старење, између осталог, обележено смањењем дермалне дебљине, а да екстринзичко старење карактерише повећање дебљине дермиса (Wlaschek и сар. 2001; Ма и сар. 2001; Nouri, 2008). И ми смо у нашем истраживању морфометријским мерењем дошли до резултата да је дермис дебљи на фотоекспонираној кожи у односу на фотонеекспонирану кожу. Ово је вероватно последица повећања простора који припада основној супстанци услед повећања количине протеогликана, који се евидентира на фотооштећеној кожи (Farage и сар. 2010).

Нема много радова који су мерили дебљину дерма, у функцији старости и фотоекспонираности на хистолошким пресецима коже. Углавном се саопштавају мерења употребом ултрасонографских метода тако да је и поређење са овим

результатима тешко и неадекватно. Резултате сличне нашим недавно су публиковали Kakasheva-Mazhenkovska и сар. (2011) који су анализирали и поредили дебљину дермиса коже капилицула у пет група: група млађих од годину дана, деца од 1 до 12 година, група адолесцената (13-22 године), група одраслих (23-55 година) и група најстаријих (56-73) године. Аутори наводе, да група млађих од годину, има просечну дебљину дермиса од 1553.8 μm , група деце до 12 година-1303.6 μm , група адолесцената најдебљи дермис од 3.7206.6 μm , одрасли-3036.5 μm и најстарији 1670.8 μm . Динамика промена дебљине дермиса у корелацији са старењем слична је нашим мерењима, сем групе млађих од годину дана, што је условљено различитом кожном топографијом испитиваних узорака.

Gniadecka и Jemec (1998) су употребом ултрасонографије урадили квалитативну евалуацију хронолошког и фотостарења коже *in vivo*. Испитивање је спроведено на 90 појединаца (29 мушкараца и 61 жена, старости 18-24 године), а мерена је ехогеност на регионима коже изложеним Сунцу (медијална и дорзална страна подлактице, чело, скочни зглоб) и регији коже која је заштићена од Сунца (кожа задњице). Саопштили су да се прогресивно смањење ехогености горњег дермиса, у функцији старења региструје на регијама коже које су стално изложене Сунцу (дорзална страна подлактице, чело) али не и у умерено изложеним регијама (вентрална страна подлактице, зглоб). На кожи задњице се бележи повећање ехогености. Ехогеност доњег дермиса је повећана на свим регијама. Такође су установили да се дебљина коже повећава са годинама на челу и бутинама, али је смањена у кожи екстремитета. Crisan и сар. (2012) су користили високе фреквенције ултразвука као неинвазивну методологију за квантификовање кожных промена у физиолошком старењу. Студија је изведена на 160 пацијената, подељених у четири узрастне категорије: < 20, 21-40, 41-60, 61-80, које су идентичне нашој узрасној расподели. Ултразвучне слике су прављене на три локације: дорзална подлактица, медијална страна руке и зигоматична регија. Процењивана је дебљина епидерма и дерма и утврђено је да се на свим регијама дермална дебљина повећава од 21. до 40. године живота. Закључак је да високофреквентни ултразвук представља неинвазивни " хистолошки " метод којим може да се процени кожна структура током старења, али да хистологија остаје златни стандард за ову процену. Њихови резултати су показали да фотостарење изазива смањење ехогености у горњем дермису, а да је насупрот томе хронолошко старење повезано са повећањем ехогености у доњем дермису. Иако је у овим истраживањима примењена другачија методологија одређивања дебљине дерма

результати су у складу са резултатима нашег истраживања и утврђеној динамици промене дебљине дерма у зависности да ли је у питању фотоекспонирана или фотонеекспонирана кожа.

Хистолошким мерењем укупне дебљине коже показане су изразите регионалне варијације. Barker је (1951) презентовао да је кожа најтања на капцима 0.33 mm, а најдебља на горњем делу леђа, 2.43 mm. Хистолошка мерења коже вршена су на 452 узорка из 28 регија тела, код корејских мушкараца и жена, а дебљина коже је варијала од 0.521 mm до 1.977 mm (Lee и Hwang, 2002). Презентоване су и вредности дебљине коже мерене ултразвучно, 3cm испод трохантера. Просечна вредност је била 1.99 mm (Demir и сар. 2006). У истраживању Laurenta и сар. 2007. године, дебљина коже је износила у просеку на натколеници 1.55 mm, струку 1.91 mm, делтоидеу 2.02 mm и на леђима супраскапуларно 2.54 mm. Мамографским мерењем дебљине коже дојки утврђена је дебљина коже од 0.5–3.1 mm (Ulger и сар. 2003).

Ми смо у нашем истраживању израчунавањем дебљине коже врата и абдомена, у студији која је обухватала 90 кадавера, узраста <1, 1-20, 21-40, 41-60 и >60 година утврдили да је дебљина коже најмања у групи фетуси/новорођена деца (1.42 mm на врату и 1.39 mm на стомаку). Са узрастом долази до повећања дебљине тако да група 1-20 година има дебљину коже од 1.83 mm, на врату и 1.79 mm, на стомаку. Група средњег животног доба (21-40) има кожу дебљине 2.58 mm на врату и 2.37 mm на стомаку, што се значајно разликује у односу на групу младих. Слична дебљина остаје и у позном животном добу на кожи врата, 2.75 mm, док је на кожи стомака значајно тања и износи 2.16 mm. Група најстаријих има значајно тању и кожу врата (1.88 mm) и кожу стомака (1.52 mm) у односу на кожу особа позног животног доба. Динамика промене укупне дебљине коже нема исти ток на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Фотоекспонирана кожа задебљава до треће декаде, остаје на том нивоу до седме декаде, а онда почиње да се тањи. Фотонеекспонирана кожа задебљава до треће декаде, а онда почиње да се тањи. Ово се може објаснити чињеницом да је фотостарење праћено задебљањем корнеалног слоја, које смо и ми евидентирали у нашем истраживању, као и нагомилавањем основне супстанце у дерму и његовим последичним задебљањем, које смо такође регистровали. И једна и друга структурна компонента се одражавају на укупну дебљину коже тј. њено задебљање које можда представља заштитни, компензаторни механизам у циљу заштите од деловања UV зрачења. И други аутори истичу да UV зрачење повећава

дебљину коже за 10 до 30% (Lopez и сар. 2004), док се дебљина коже смањује са старењем (Ulger и сар. 2003).

Поред ефеката зрачења и старења, на дебљину коже утиче и хормонска супституциона терапија, примењена у менопаузи. Наиме, утврђено је да су жене које су примале ову терапију имале значајно задебљање коже (Demir и сар. 2006). С друге стране, појава атрофије коже јавља се и код неких дерматолошких обољења, приликом третмана кортикостероидима, дејства спољашњих фактора итд. (Марковић, 2011).

У литератури су присутна изразита неслагања о промени дебљине коже током старења. Горелова (2010) саопштава да током првих 20 година живота долази до повећања дебљине коже, затим следи период, било константне дебљине, било прогресивног стањивања и најзад период израженијег стањивања код старијих појединаца. Она закључује, да би дијаграм који презентује дебљину коже у односу на животну доб изгледао као звонаста крива, што се подудара са нашим резултатима.

Употребом ултрасонографије Б типа Pellacani и Seidenari су приметили повећање дебљине коже лица, у корелацији са старењем, код 40 људи старости од 25 до 90 година (Pellacani и Seidenari, 1999). У већој студији која је обухватала 170 жена старости од 17 до 76 година користећи ултразвук А типа (A mode ultrasound), Такема и сар. (1994) дошли су до података да са старењем долази до значајног стањивања коже заштићене од Сунца и задебљање коже изложене Сунцу. Студија ултразвуком Б типа која је укључивала 61 жену старости 18-94 године дошла је до података да се са старењем дебљина коже повећава на челу и задњици, а смањује на екстремитетима (Waller и Maibach, 2006). Резултати свих наведених ултрасонографских студија су сагласни да са старењем долази до значајног задебљања фотоекспониране и стањења фотонеекспониране коже. Овај закључак је у складу са резултатом наше студије, иако у истраживањима нисмо користили исту методологију.

Међутим, има и студија које су ултразвучним мерењем дебљине коже показале стањивање коже на фотоекспонираним регијама, у корелацији са старењем. Студија ултразвуком коју су спровели Richard и сар. (1994) анализира је ефекте старења на две анатомски сличне области врата, једне изложене Сунцу током целог живота, а друге покривене. Овај експеримент је укључивао 30 жена старости 81 ± 6 година и дао податке о стањивању коже (приближно 0,1 mm разлике) на фотоекспонираном региону у односу на фотонеекспонирану кожу.

Разлике између презентованих студија могу бити приписане старијој популацији у Richard-овој мањој студији, и коришћењу различитих типова ултразвука. Richard и сар. (1994) сугеришу да је могуће да соларна еластоза доводи до задебљања коже код млађих појединаца, али престаје да се дешава код старијих људи. Да би истраживачи дошли до сагласности о овој теми, за будућа истраживања би било важно да се фокусирају на стандардизоване делове коже, уз усаглашену узрасну периодизацију, полну дистрибуцију, сагледавање хормонског статуса, како би лакше могли да пореде своје резултате.

Базална мембрана представља границу између епидерма и дерма, а један од најкарактеристичнијих знакова хронолошког старења коже је њено заравњење, узроковано смањењем броја дермних папила, односно епидермних пречки (Al-Habib и Kadhim, 2012). Заравњивање епидермно-дермне границе у корелацији са старењем је хистолошки регистровано и на ултраструктурном нивоу. У истом истраживању утврђено је да у младој кожи базалне ћелије пружају бројне вилозне цитоплазматске пројекције у дермис, што обезбеђује веома испреплетану епидермно-дермну границу. Насупрот томе, базалне ћелије старе коже немају продужетке и додирна површина је заравњена (West, 1994).

Квантификација дермно-епидермног споја у нашем истраживању вршена је одређивањем површинске арее овог споја у програму *ImageJ*, а хистолошка анализа на препаратима бојених *HE* техником. Праћен је начин организације и форма базалне мембране, присуство епидермних гребена и њихова организација.

Нормална таласаста хистолошка организација епидермно-дермне границе види се у кожи фетуса и новорођене деце, кожи раног животног доба и кожи средњег животног доба. Почетни губитак епидермних гребена, као и благо заравњење епидермно-дермног споја региструје се узорцима коже врата у групи позног животног доба. На неким препаратима фотоекспониране коже позног и најстаријег животног доба уочили смо неправилну пролиферацију епидермних пречки дубоко у дерм, уз ремећење уобичајене таласасте границе епидерма и дерма. Епидермне пречке су често задебљале на својим врховима и формирају мрежасту структуру. У кожи старијих људи изразитије стањивање епидермиса је примарно изазвано повлачењем епидермних гребена (пречки) из дермиса, што доводи и до заравњивања додирне површине између епидермиса и дермиса.

Користећи скенинг електронску микроскопију Hull и Warfel (1983) су дошли до закључка да је таласаста папиларна епидермно-дермна граница видљива и у шестој

деценији, а да до заравњивања долази од шесте до десете деценије. Ово заравњивање може бити повезано и са умањеним пролиферативним потенцијалом старог епидермиса и може да утиче на абсорпциону функцију коже. И ми смо у нашој студији запазили присуство таласасте епидермно-дермне границе у неким узорцима коже старијих од 60 година, али углавном у дегенеративној, неправилној форми. Такође смо уочили да је заравњивање базалне мембране најочигледније у групи најстаријих тј. старијих од 60 година.

Резултати наше морфометријске студије показују да је површина арее дермно-епидермног споја коже врата у групи новорођенчади 0.039 mm^2 . Са узрастом се повећава површина овог споја тако да у групи раног животног доба његова вредност износи просечно 0.044 mm^2 , а своју максималну вредност достиже у групи особа старости 21 до 40 година, где износи 0.046 mm^2 . Са даљом узрасном прогресијом долази до снижавања ове вредности, па у групи особа старости 41 до 60 година износи 0.037 mm^2 и 0.020 mm^2 у групи најстаријих.

Кожа стомака има сличан тренд раста и опадања површине дермно-епидермне арее. У групи новорођенчади она има вредност 0.041 mm^2 , код раног животног доба 0.045 mm^2 и у групи средњег животног доба 0.051 mm^2 . Особе старости од 41 до 60 година имају нешто нижу вредност која износи 0.044 mm^2 , која у групи најстаријих још више опада и достиже ниво од 0.026 mm^2 .

Резултате сличне нашим презентовао је Katzberg (1985). Он је у својој студији анализирао кожу абдомена, мерећи површинску ареу дермно-епидермног споја и регистровао смањење површине са 2.64 mm^2 , особа од 21 до 40 година на 1.90 mm^2 особа старости 61 до 80 година.

Наше истраживање показује да се површина епидермно-дермног споја смањује у корелацији са старењем и то изразитије на фотоекспонираној кожи. Ово је у складу са другим истраживањима који такође евидентирају значајно заравњивање базалне мембране, а самим тим и смањење површине епидермно-дермног споја на кожи која је изложена UV зрачењу. Добро је познато да при хроничној инсолацији у површним слојевима епидерма долази до појаве хиперкератозе, појаве атипичних кератиноцита и заравњења базалне мембране (Хертел, 2000). Дуготрајна експозиција коже UVA зрачењу доводи до заравњења дермно-епидермног споја, губитка епидермних пречки и задебљања ламине дензе (Gilchshrest и сар. 1996; Bernerd, 2005).

Al-Nabib и Kadhim (2012) саопштавају да старење утиче на епидермно-дермну границу тако што доводи до поравњавања дермних папила, губитка епидермних

гребена и задебљања базалне мембране. Закључују да би у механизам ове појаве могао бити укључен ниво хормона са утицајем на продукцију компоненти базалне мембране, колагена тип IV и колагена тип VII.

Велики број студија је поред заравњења базалне мембране регистровао и промене и на колагеним влакнима. Показано је да је у фотооштећеној кожи број усидравајућих фибрила значајно мањи у односу на фотозаштићене зоне коже (Craven и сар. 1997; Contet-Audonneau и сар. 1999; Watson и сар. 1999). Chen и сарадници су у истраживањима спроведеним на културама ћелија хуманих фибробласта и кератиноцита који су излагани UVA зрачењу постигли повећану iRNK за колаген типа VII од стране фибробласта и њено лагано смањење у култури хуманих кератиноцита (Chen и сар. 1997). Такође, колаген типа IV је важан елемент стабилности базалне мембране (Timpl, 1996), али у студијама које су обухватале компарацију између фотоекспониране и фотонеекспониране коже није нађена сигнификантна разлика у заступљености овог типа колагена (Boorsma и сар. 1996; Contet-Audonneau и сар. 1999; Inomata и сар. 2003). Ремећење хистолошке стабилности и организације базалне мембране на фотоекспонираној кожи може бити повезано са повећањем ензима плазмина и MMPs-а који деградирају компоненте базалне мембране (ламинин 5, колаген тип IV и колаген тип VII). Улога епидермиса у производњи инхибитора активатора плазминогена, као и његова могућа већа производња у одраслих, у односу на кожу фетуса или новорођене деце, предложена је пре много година као објашњење постепеног губитка флексибилности и повећане скелетне ригидности код старења (Ryan, 1989).

Оштећење структуре епидермно-дермног споја смањује функционални капацитет епидерма и дерма, што такође може убрзати процес старења, оштећење екстрацелуларног матрикса и појаву дегенерације кератиноцита (Amano, 2009). Смањење колагена тип VII узрокује смањење везе између епидермиса и дермиса и представља један од узрока појаве бора (Farage, 2010).

Yoshihisa и сар. (2014) су након студије на кожи мишева, саопштили да је деградација компоненти базалне мембране након деловања UVB зрачења посредована деловањем макрофагног фактора инхибиције миграције (MIF) (engl. Migration inhibitory factor), кроз активирање MMP-2 и MMP-9 и инфилтрацију неутрофила у кожу. Сходно томе, аутори износе закључак да би инхибитори MIF-а, попут ISO-1 (engl. isoxazoline), могли да превенирају активирање MMPs и спрече прилив неутрофила у кожу, а самим тим и последично оштећење базалне мембране.

На основу наших и резултата других истраживача, мишљења смо да одређивање површине епидермно-дермног споја може бити важан показатељ и маркер како хронолошког, тако и фотостарења коже.

Колаген је главни конституент дерма коже, а промене у бојењу, изгледу и количини колагених влакана дерма, једна су од најважнијих хистолошких карактеристика и хронолошког и фотостарења коже. У нашем истраживању за идентификацију колагена, поред класичне НЕ технике, коришћена је хистохемијска метода по Van-Giesonu. При анализи колагена праћени су његова пријемчивост за боје, начин организације колагених снопова, њихова густина, дужина, дебљина, вијугавост, испруганост и волуменска густина.

На препаратима коже новорођенчади, као и коже узраста 1-20 година, и на фотоекспонираним и фотонеекспонираним регијама у папиларном слоју дерма снопови колагених влакана су танки, узани, растресити и усмерени углавном према површини епидерма. У ретикуларном слоју дерма снопови колагених влакана су дебели, често вијугави и усмерени у свим правцима. Дубоки дермис изгледа гушће од површног дермиса у коме се налази неорганизована и неорјентисана мрежа влакана. Снопови колагена су пријемчиви за боје и показују попречну испруганост. Запажена организација колагене мреже је у складу са студијом Epstein (1974) која је показала да кожа фетуса и новорођене деце садржи више колагена тип III него кожа одраслих. Колагена влакна дечије коже имају танковлакнасту структуру због великог садржаја колагена тип III који има главну улогу у формирању дермалне архитектуре.

Узорци коже групе од 21-40 година имају сличну архитектуру и на кожи врата и на кожи стомака. Колагена влакна су углавном очуване структуре и дискретно редукованог волумена, посебно на фотоекспонираној кожи. На свим узорцима које смо анализирали афинитет за боје је био очуван. И други аутори истичу да се на светлосној микроскопији може уочити да површински, папиларни слој дермиса садржи фину мрежу уских снопова колагених влакана, док дубљи ретикуларни слој садржи дебље снопове колагених влакана (Pinkus и сар. 1981; Lever и сар. 1983; Leeson и сар. 1988; Abraham, 2002).

Прве значајније промене структуре колагена које смо уочили у хистолошкој анализи, појављују се након 40 година старости на фотоекспонираној кожи и прогредирају са старењем. Најпре су погођена најтања влакана папиларног дермиса, која пролазе кроз процес фрагментације и на крају лизе. Постепено смањење везивних влакана доводи до смањења густине папиларног дермиса, мада има и узорака на

којима се уочава повећање густине колагених влакана, што је вероватно последица чињенице да лизом најпре страдају најтања колагена влакна (негде потпуно нестају), а за то време само она која су мало дебљи остају. Ово донекле даје лажну слику повећане густине колагена, иако је она практично смањена. Промењена колагена влакна се некада спајају и формирају слепљене плоче или поља, како у папиларном, тако и у ретикуларном дермису. И други аутори износе запажање да су у деловима еластозно измењеног дерма колагена влакна ретка и неправилне грађе, за разлику од густог, конфлуентног садржаја колагена у површинским деловима дерма (Bernstein и сар. 1994; Bernstein и Uitto, 1996).

Мишљења смо да након промена у папиларном дерму, долази до промена на нивоу ретикуларног дерма, у виду већег згушњавања колагених влакана, што вероватно представља компензаторни одговор на ослабљени отпор коже на површини. Након тога и у ретикуларном дерму долази до фрагментације и лизе колагена, па се могу видети снопови који су изразито дебели и пријемчиви за боје, али и танки, вијугави снопови, местимично фрагментовани и мање пријемчиви за боју. Лизирани колагени влакна заузимају мањи део ЕЦМ-а, чинећи да простор који припада основној супстанци расте по величини. И други истраживачи истичу да са старењем долази до значајних промена у структури колагена, као и промени односа различитих врста колагена који су дермни конституенти. Они такође запажају да са старењем долази до дезорганизације и проређености колагених снопова, појаве форми са лабавим фибрилама и снижавања укупне количина колагена (Uitto и сар. 1998; Oikarinen, 1994; Rebrova и сар. 2003) због повећања експресије матриксних металопроотеиназа, са највећим утицајем MMP-1 (Varani и сар. 2000). UV зраци узрокују смањење продукције колагених влакана и дегенерацију колагене мреже (Farage, 2010). При фотостарењу коже колагени влакна су краћа, тања и дезорганизована (Varani и сар. 2001), а појава фокалног слепљивања колагених влакана узрокована је међусобним повезивањем влакана (Kligman и сар. 1989; Kligman, 1996; Fisher и сар. 1997; Ou-Yang и сар. 2009) и образовањем колагених димера, посредством различитих механизма (Марголина, 2005). Структурне промене дермиса представљају основу процеса фотостарења коже, а степен оштећења дермних структура расте са поновљеним експозицијама и растом кумулативне дозе UV зрачења. У бројним студијама је показано да понављане дозе UVA зрачења индукују појаву хистолошких промена у дерму и растући ниво MMPs-a, што се клинички

манифестује у виду бора и других знакова карактеристичних за фотостарење (Lavker и сар. 1995; Marmur и Amir, 2007).

Butler и Fosko (2010) и Mac-Mary и сар. (2010) су у независним студијама показали да се промене карактеристичне за фотостарење коже, као што су ирегуларне пигментације, премалигне и малигне лезије, губитак тонуса и еластичитета, већа дубина и учесталост бора, учесталије јављају на страни лица возача која је окренута прозору.

У нашем истраживању на узорцима коже врата позног животног доба запазили смо да у очуваним колагеним сноповима преовлађују фиброцити, док су у оштећеним сноповима знатно бројнији фибробласти. Укупан садржај колагена је смањен и поред, вероватно неизмењене синтетске функције фибробласта, што упућује на присуство повећане протеолизе колагена у актинично оштећеној кожи. Бројније присуство фибробласта је вероватно реактивна појава у циљу надокнаде изгубљеног колагена (Bernstein и Uitto, 1996; Bernstein и сар. 1996). Слично запажање износе Bonta и сар. (2013) који су у хистолошкој анализи различитих регија коже, пратили промене колагених и еластичних влакана у корелацији са узрастом. Анализирали су 121 узорак коже, узраста од 2 до 85 година и саопштили да се прве евидентиране промене у структури колагене мреже евидентирају код особа старости од 50 и више година у смислу његове редукције.

У истраживаним узорцима, коже која је била заштићена од Сунца, особа најстаријег животног доба, приметно је да је колаген у основи јако редукован и да му количина и начин организације у многоне варирају. Могу се видети кратки, танки сегменти, а често се запажају остаци колагена у виду зрнастог материјала. Простор који припада екстрацелуларном матриксу је последично повећан. Ово је у складу са студијом Lovell и сар. (1987) који су мишљења да са старењем долази до редукције колагена тип I и нешто мање колагена тип III, мада Гетлинг (2002) истиче да са старењем долази и до значајног смањења колагена тип III. У неколико узорака коже најстаријих, у ретикуларном дерму смо запазили и широке плоче, формиране од међусобно слепљених колагених влакана. Слично запажање имао је Качахидзе (1970), који је на основу хистолошких и морфолошких истраживања, саопштио да колагена влакна, на почетку старости (60-74 године) губе лонгитудиналне бразде због везивања и хомогенизације. Са даљим старењем ове промене прогредирају (> 90 година) и доводе до тога да се крупна колагена влакна слепљују међу собом и формирају широке плоче, али и „развлакњавају“ и „расејавају“. Uitto (2008) такође запажа да и

интризичко старење има драматични учинак на мрежу колагених влакана у људској кожи. Повећана редукција и смањење дијаметра колагених влакана који се виде код старења може узроковати смањење издржљивости и растегљивости коже (Vogel и сар. 1983).

Резултате сличне нашим недавно су публиковали Abd El-Aal и сар. (2012) који су анализирали колаген коже леђа (фотонеекспонирана регија), две старосне групе. Колаген је бојен Masson трихромним бојењем, а показано је да су снопови колагених влакана танки, нејасни и фрагментисани код 47% коже старијих, умерено задебљале траке колагена су евидентирани код 4.5% коже старијих, а задебљали, плаво обојени снопови колагена су уочени код 18.2% старијих испитаника. Код млађе групе запажају се задебљали и/или плаво обојени снопови у 73.3% случајева, док су умерено задебљали снопови колагена запажени у 26.7% коже млађих испитаника. Танки, фини и/или нејасни снопови колагена нису нађени ни код једног од млађих субјеката.

Gogly и сар. (1997) радили су морфометријску анализу колагених влакана у нормалној кожи и гингиви код људи старости од 10 до 75 година и утврдили да са старењем дебљина снопова колагених влакана расте у кожи, као и да постоји прогресивно умањење удела везивног ткива које садржи колагена влакна. Промене су значајније изражене у средњем дерму и у 50-тим годинама. Ове акумулације колагена могу се објаснити повећаном синтезом и депозицијом колагена тип III, или интеракцијом са другим матриксним молекулама, као што су протеоглици (Lovell и сар. 1987). Verzar (1964) је раније саопштио да током старења долази до унакрсног везивања колагених влакана, што може бити разлог смањене осетљивости колагена на дејство каталитичких ензима и његову последичну акумулацију са старењем.

Резултати наше стереолошке студије показују да највећу волуменску густину (ВГ) колагена има кожа фетуса/новорођенчади, а да редукција колагена у фотоекспонираној кожи почиње после 40 година, а у фотонеекспонираној после 60 година. Разлике у садржају колагених влакана на фотекспонираним и фотонеекспонираним регијама коже позног и најстаријег животног доба са статистички сигнификантним већим вредностима на кожи стомака указују да хронична изложеност UV зрачењу има значајни ефекат на количину колагених влакана у дерму тј. његову редукцију.

Резултате сличне нашим представио је Mazyala (2008) презентујући смањење колагена и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи, у корелацији са

узрастом. Смањење колагена било је евидентирано индиректно, мерењем релативно повећаног празног простора који припада основној супстанци. Он је такође запазио, да са старењем долази и до смањења дебљине колагених влакана у ретикуларном дермису. Mazyala даље износи и запажање да је редукција дебљине колагених снопова у ретикуларном слоју изразитија на фотоекспонираној кожи, а да се на фотонеекспонираној кожи евидентира њихово задебљање. Нешто раније De Backer и сар. (1998) су значајно умањење колагених влакана на фотонеекспонираној кожи евидентирали тек у 80- тим годинама живота испитаника.

Ово је у складу са студијом El-Domyati и сар. (2002) у којој су такође показане, узрасно-зависне, квантитативне и квалитативне промене колагених влакана. Међутим, они су уз постепену редукцију количине колагених влакана у фотозаштићеној кожи, драматичније смањење евидентирали тек у осмој деценији, што је сагласно нашим резултатима. Разлика у динамици редукције колагена између резултата наше студије и истраживања El-Domyati и сар. (2002) може се објаснити употребом различитих бојења за идентификацију колагена. Наиме, у нашем истраживању коришћено је хистохемијско бојење по Van-Gieson, док су El-Domyati и сар. (2002) користили имунохистохемијска бојења, са антителима против колагена тип I и III, која су очигледно специфичнија од хистохемијског. Разлике се вероватно и последица утицаја климатских специфичности (већа хронична инсолација код њихових узорака), као и различитих фототипова коже који су истраживани. Наиме, ми смо истраживали узорке коже који најчешће припадају типу II i III по Fitzpatrick-у, док се њихово истраживање односило на кожу која припада типу IV i V.

Према тврђењу Du Toit и сар. (2007) за сам процес старења коже, као и клиничке манифестације тог процеса, великим делом су одговорни дисфункционални фибробласти. Doljanski и сар. (2004) истичу да се број синтетски активних ћелија, фибробласта, смањује квантитативно и квалитативно током старења. Овај налаз је у складу са студијама које сугеришу употребу фацијалне рејувенационе технологије и *antiaging* метода у којима се користе културе сопствених дермних фибробласта, ради поспешивања синтезе колагена (Zorina, 2011).

Mohammad и сар. (2004) су установили да дермни фибробласти из различитих слојева коже имају хетерогену експресију колагеназа и mRNA проколагена тип I и III. Под претпоставком да су запажања коректна, то значи да неки дермни фибробласти, у зависности од слоја и микролокалитета коже, преференцијално изражавају тип I проколагена, а други тип III проколагена. Закључили су, да се у ретикуларном дерму

фотоекспониране коже, у поодмаклом старосном добу, смањује дебљина колагених снопова и да соларно оштећење погађа више фибробласте који експримују тип I проколлагена, са последичном редукијом количине синтезе колагена тип I (Mohammad и сар. 2004).

Интересантан је и налаз да постоји велика разлика у архитектури колагених влакана на фотоекспонираној и фотонеекспонираној кожи. Фотозаштићена кожа горње трећине дерма бедра има организована влакна у слојевима, у свим старосним групама (Mohammad и сар. 2004). Насупрот томе, фотоекспонирана кожа показује дезорганизованост већ у трећој декади што се погоршава са годинама. Наш је утисак, такође, да без обзира која хистолошка слика доминира на фотонеекспонираној кожи, ни на једном узорку нисмо регистровали „неуређеност“ и „дезорганизованост“, каква се види на фотоекспонираној, с том разликом што смо дискретне промене архитектоники фотоекспониране коже регистровали у групи позног животног доба (41-60 година), а израженије у групи старијих од 60 година. Mohammad и сар. (2004) су мишљења да ово оповргава хипотезу да је непоуздано различиту колагену морфологију коже доводити у везу са старосну, полом и локализацијом. Потребна су даља истраживања да би се утврдило да ли оваква организација колагених влакана има било какву протективну функцију у фотоекспонираној кожи.

Du Toit и сар. (2005) закључују да старење коже почиње око 25. године, са видљивим знацима око 28. године старости. El-Domyati и сар. (2002) почетак дезорганизације колагене хистоархитектуре региструју у 4. деценији, на фотоекспонираној кожи, што смо и ми евидентирали у нашем истраживању.

Одговор на важно питање које се односи на биолошке изворе и механизме укључене у лизу колагена тражили су бројни истраживачи. Lee и сар. (1997) су мишљења да смањење колагена у везивном ткиву, током старења, може бити исказ неконтролисано повећане фагоцитозе колагена у којој губитак колагена надмашује његову синтезу. Бројни истраживачи истичу да се највећи степен деградације колагених влакана бележи у фотоекспонираним регијама коже (Kligman и сар. 1989; Kligman, 1996; Fisher и сар. 1996; Fisher и сар. 1997; El-Domyati и сар. 2002; Silva и сар. 2009; Ou-Yang и сар. 2009), као и да су ова оштећења првенствено резултат оксидационог стреса, који доводи до појачане активације MMPs-a, оштећења структурних протеина, липида и DNK (Wondrak и сар. 2003; Wondrak и сар. 2006).

Brincat и сар. (1987) истичу да супституциона терапија полним хормонима превенира смањење количине колагена код жена у менопаузи.

Биохемијску потврду смањења колагена на фотооштећеној кожи најпре су презентовали Smith и сар. раних шездесетих година. Они су саопштили да је кожа подлактице или врата показивала просечно смањење садржаја хидроксипролина од 45%, у поређењу са фотозаштићеном кожом, узетом са кадавера, као и да је нерастворљиви колаген смањен око 50%, а солубилна фракција повећана (Smith и сар. 1962; Kligman и сар. 2000). Oikarinen и Kallioinen (1989) су у истраживању парних биопсија врата и абдомена, као и коже лица у односу на аксилу старијих људи, просечне старости 62 и 72 године, регистровали мале промене у растворљивим киселинама или пепсином разложеном колагену, у фотоекспонираној кожи, у поређењу са заштићеним, фотонеекспонираним зонама. Супротно томе изучавајући екстремна соларна оштећења коже, као што су *Cutis rhomboidalis nuchae*, Schwartz и сар. (1993) су показали 20% смањење укупног садржаја колагена, у поређењу са контролном групом. Ово смањење је праћено 38% повећањем солубилне фракције у поређењу са заштићеном кожом. Oikarinen и Kallioinen (1989) су у имунохистохемијској анализи, употребом анти-фибронектин антитела показали да је фотоекспонирана кожа лица у горњим слојевима дермиса преплављена еластозним материјалом, а Schwartz и сар. (1993) су применом индиректне имунофлуоресценце и антитела за еластин и колаген тип I тип III, показали обилно обојен еластозни материјал са минималним бојењем за колаген на фотоекспонираној кожи.

Несумљиво да количина колагена корелише са нивоом продукције матриксних металопроотеиназа и ткивних инхибитора матриксних металопроотеиназа, а дисбаланс између MMPs и TIMPs може се повезати са патолошком разградњом екстрацелуларног матрикса (Kondo, 2000). Бројне студије су показале да је синтеза MMPs и TIMPs модулисана цитокинима (Dayer и сар. 1985; Bauer и сар. 1985; Postlethwaite и сар. 1988; Edwards и сар. 1987; Mauviel, 1993). Цитокини који се доводе у везу са деструкцијом колагена су IL-1 α , IL-1 β и IL-6 (Dayer и сар. 1985; Postlethwaite и сар. 1988; Wlaschek и сар. 1994), а Такође је установљено да је количина колагена у директној пропорцији са концентрацијом IL-4 (Zhang и сар. 1998) који је хемоатрактант за фибробласте (Postlethwaite и сар. 1991) и који их индукује да секретују протеине ЕЦМ-а, као што су колаген тип I, III и фибронектин (Fertin и сар. 1991; Gillery и сар. 1992; Postlethwaite и сар. 1992), а да инверзно корелише са концентрацијом IL-1 β , IL-6, PDGF (engl. Platelat derived growth factor) и TNF- α . Показано је да је продукција MMP-1 (колагеназа) стимулисана и од стране трансформишућег фактора раста-бета (TGF- β), фибробластног фактора раста β (FGF

β) (engl. β Fibroblast growth factor) и епидерманог фактора раста (EGF) (engl. Epidermal growth factor). Синтезу MMPs индукују и GM-CSF удружен са TNF- α или IL-1 β . Демонстрирана је IL-1 стимулирана продукција TIMPs од стране фибробласта (Postlethwaite и сар. 1988). EGF и β FGF такође индукују синтезу TIMPs од стране хуманих фибробласта. Претпоставка је да TGF- β модулише деловање ових фактора раста и утиче на експресију MMPs и TIMPs (Edwards и сар. 1987). Слично TGF- β , PDGF појачава остале цитокинске ефекте на MMPs (Circolo и сар. 1991), што значи да су TGF- β и PDGF важне компоненте одржавања баланса ткивног ремоделовања и обнављања. У студији Quan и сар. (2010) испитивана је улога TGF- β /Smad пута и фактор раста везивног ткива CTGF (engl. Connective tissue growth factor) у смањењу производње колагена у људској кожи у корелацији са старењем. Њихови резултати показују значајно смањење TGF- β и CTGF у фибробластима старе коже *in vivo* као и да продукција проколагена тип I у фибробластима зависи од оба фактора- TGF- β и CTGF.

Поред смањења синтезе колагена због старости фибробласта (Varani и сар. 2000), Mammone и сар. саопштавају да постоји пораст апоптозе код старијих фибробласта (Mammone и сар. 2006).

Такође, не сме се занемарити чињеница да деградација екстрацелуларног матрикса може бити последица и дисбаланса у продукцији супстанци попут хемокина и протеаза, као и њихових активатора и инхибитора, од стране резидентних и миграторних инфламаторних ћелија (Ochoa и сар. 2008) чије смо значајније присусво и ми евидентирали у овој студији.

На основу свих поменутих истраживања, чији су резултати у потпуној сагласности са нашим, може се извести закључак да квантитативна евалуација ВГ колагених влакана коже може бити значајан показатељ и хронолошког и фото старења коже.

По мишљењу Freinkel-а и Woodley-а (2001) атрофија епидермиса која се евидентира са старењем повезана је са смањењем капиларне мреже, губитком папиларног дермиса и смањењем броја и величине базалних кератиноцита, што води смањеној пролиферацији у епидермису. Такође се зна, да се најважније промене које су резултат процеса старења налазе у дерму, а да је смањење капиларне мреже један од маркера старења у (Nouri, 2008).

У нашем истраживању за идентификацију васкуларне мреже, поред класичне HE технике, коришћена је хистохемијска метода по Van-Gieson. Такође смо, у програму *Image J* одредили њихову ВГ.

Микроваскулатуру коже сачињавају артериоле, артеријски и венски капилари и венуле, који у дерму формирају две хоризонталне васкуларне мреже: горњу у папиларном дерму, од које се одвајају капиларне петље за папиле дерма и доњу, на граници између дерма и супкутаног ткива, изграђену од крупних артериовенских анастомоза са мало капилара (McLafferty и сар. 2012). Са крвним судовима коже тесно је повезано лимфатично корито, које има дренажну функцију. Површинска лимфна мрежа почиње из папиларних синуса, образујући између артеријске и венске мреже лимфни плексус. Лимфа из површног отиче у субдермални лимфни плексус. У кожи старих људи лимфни судови и површинског и дубоког плексуса, често су склерозирани и проширени што узрокује излазак елемената плазме у околно ткиво, едем и нарушавање лимфотока, развој последичне хипоксије, накупљање слободних радикала и погоршање дегенеративних процеса (Nouri, 2008). Нормална, млада кожа садржи приближно 60 капиларних петљи по cm^2 , а са старењем се тај број смањује (Ryan и сар. 2004).

Резултати наше студије показују да промене васкуларне мреже у корелацији са узрастом имају исту динамику и на фотоекспонираној и на фотоекспонираној кожи. Након регистравања већих вредности ВГ васкулатуре у кожи раног и средњег животног доба, долази до редукције заступљености крвних судова, која се евидентира статистички значајно нижим вредностима ВГ у кожи позног и најстаријег животног доба, са израженије мањим вредностима на фотоекспонираној кожи.

Наши резултати су у складу са студијама које су утврдиле да се густина површинских капиларних петљи смањује са старењем и да је повезана са атрофијом површинског дермиса (Kelly и сар. 1995; Li и сар. 2006). Наиме, Li и сар. (2006) су радили истраживање густине капиларне мреже у дерму старих особа (60-74 године) и установили 66% редукцију густине капилара на воларној (фотоекспонираној) страни коже подлактице, у поређењу са младом групом. Сличан резултат показан је и на мишевима (Vollmar и сар. 2000). Доста раније Pearse и сар. (1994) су такође презентовали да са старењем долази до смањењења васкуларних петљи 40% на челу и 37% на подлактици. Међутим, без обзира на овако промењену васкулатуру, целокупни крвни флуks може бити повећан услед експанзије паралелне васкулатуре у дубоком дермису (Kelly и сар. 1995; Li и сар. 2006).

Неки аутори истичу да промене густине кожане васкуларизације, између група могу бити приписане различитим анатомским местима која се анализирају. Истовремено за тумачење резултата може бити проблематичан и фактор степена експонираности индивидуа (Chung и сар. 2002; Toyoda и сар. 2001) који ми, у нашем истраживању, нисмо могли сагледати.

Хистолошком анализом истраживаних узорака, уочили смо да кожа млађих од 40 година садржи богату капиларну мрежу. Површински дермис је добро васкуларизован и садржи бројне мале крвне судове, посебно у областима коже која има дебљи епидермис. Када папиларни дермис почиње да показује суптилне промене на колагеним влакнима, региструју се и прве промене у микроваскулатури. Ово се види на узорцима коже старијих од 40 година, у виду смањења пречника крвних судова. Такође смо приметили да васкулатура у папиларном дермису остаје дуго непромењена, чак и у старијем добу, ако папиларни дермис има папиларни аспект. Са постепеним нестанком папила, смањују се и крвни судови, по величини и бројчано. Како процес старења напредује, посебно на кожи врата, крвни судови постају мали и ретки, односно бројчано смањени. Слично запажање презентовали су Bonta и сар. (2013), који су у својој квалитативној хистолошкој студији значајније промене васкуларне мреже, у смислу редукције и структурних промена зидова крвних судова, регистровали код особа старијих од 50 година. Смањење броја крвних и лимфних судова највероватније је последица деградације екстрацелуларног матрикса који више не омогућава потпору васкулатури (Chung и Eun, 2007; Kajiya и сар. 2007).

Узорци коже најстаријег животног доба, посебно фотоекспониране регије, показују промене у дебљини зида капилара и мањих крвних судова, заравњавање и задебљање *laminae elastice interne*. Уз промене у грађи васкуларног зида, долази и до повећања васкуларне пропустљивости. Такође смо уочили да је лумен неких крвних судова много шири, што сугерише стазу. Ово је у складу са истраживањима, чији аутори истичу да је са старењем повезана и ендотелна дисфункција (Matsushita и сар. 2001; Levakov и сар. 2012; Bonta и сар. 2013). Такође, једна од карактеристика фотостарења коже је и појава хроничног запаљења са периваскуларним инфилтратом (Lavker и сар. 1995; Kligman, 1996), коју смо и ми запазили на нашим истраживаним узорцима фотоекспониране коже старијег животног доба. Према савременом концепту, нарушавање микроваскулатуре обавезно доводи до развоја инфламације, дистрофичних и инволутивних процеса (Имаева и сар. 2008).

Ангиогенетски фактор, продукт епидерма, који тренутно побуђује највећи интерес је васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF) (Ferrara, 2000). У епидермису се производи VEGF који делује врло моћно на пропустљивост крвних судова. Један од ефеката је излазак плазме у папиларни дермис, проширење и едем површинског дермиса са последичним утицајем на ендотел (Ryan, 1995; 2003). VEGF је мултифункционалан гликопротеин молекуларне тежине од 34 до 45 kD који има утицај на ендотел крвних судова, преко две врсте рецептора са активношћу тирозин киназе: flt-1 и KDR. Интеракцијом између VEGF-а и рецептора долази до четвороструког пораста цитоплазматског калцијума (Ca^{2+}) у ендотелним ћелијама, а након тога и до повећења пермеабилности малих крвних судова, посебно посткапиларних венула. Последица ове интеракције је накупљање малих пептида у екстрацелуларном простору и активација MMPs-а, који разлажући протеине матрикса стварају основу и чине нову подлогу, која ће омогућити пролиферацију, диференцијацију и миграцију ендотелних ћелија и формирање новог матрикса (Plate и сар. 1992; Brown и сар. 1993; Grunewald и сар. 2006). Новоформирани екстрацелуларни матрикс је потпора ендотелним ћелијама и фибробластима за миграцију (Орасмјэ и Глаголева, 2011). VEGF доводи и до подстицаја других чиниоца битних за ангиогенезу, попут активатора плазминогена (PAs) и интерстицијских колагеназа које делују на деградацију колагених влакна и на тај начин ослобађају простор за раст нових крвних судова (Ryan и сар. 2004; Орасмјэ и Глаголева, 2011). И догађаји током инфламације, попут изласка протеина и таложења фибрина из крвних судова једно су од објашњења ангиогенезе изазване VEGF-ом (Eliceiri и сар. 1999).

Поред тога, зна се да дермис садржи и друге факторе који доводе до пермеабилности крвних судова, попут генерације простагландина које секретују мастоцити (Dvorak, 1986).

Дегенеративни процеси који захватају крвне судове у току старења, вероватно не мењају све крвне судове у исто време, тако да се могу видети крвни судови са нормалном структуром, али и они са веома израженим алтерацијама. Такође смо приметили да су најмањи крвни судови, са најтањим зидовима, највише изложени променама. Слично запажање износе Bonta и сар. (2013) који су у својој хистолошкој студији узрасних промена структуре колагена, еластичних влакана и васкуларне мреже у кожи, саопштили да са старењем долази до промена у грађи зидова крвних судова, и то најпре капилара, у виду њиховог стањења, а потом смањења величине

пречника и бројности. Иако су истраживања везана за васкуларну регресију, у функцији старења, сложено поље које може имати велики значај за откривање механизма који су везани за сам процес старења коже, важна су и за патогенезу и могуће терапијске стратегије код неких дерматолошких поремећаја нпр. псоријазе (Creamer и Barker, 1995; Bhushan и сар. 2002).

Јасно је да је апоптоза ендотелних ћелија важна за старење, а VEGF изазива експресију анти-апоптотичких протеина (Gerber и сар. 1998). Васкуларни ендотелни фактор је врло важан чинилац у фази регенерације ткива. Његова улога, медијатора васкуларне пропустљивости је кључна у процесима физиолошке и патолошке ангиогенезе и инфламације, посебно ако се зна да га излучују туморске ћелије, макрофаги и друге ћелије које учествују у процесу имунског одговора (Perreg и сар. 1991; Unemori и сар. 1992).

Присуство васкуларног ендотелног фактора раста се не може евидентирати у нормалној, здравој кожи. Међутим, механичке и термичке повреде на кожи изазивају јаку стимулацију експресије овог фактора, што је временски и просторно у корелацији са формирањем нових крвних судова (Detmar и сар. 1995; Brown и сар. 1995a; 1995b).

Ми смо у нашем истраживању одређивали ниво експресије VEGF-a у складу са системом бодовања који оцењује степен позитивности и интензитет бојења ћелија које експримују овај маркер. Највиши скор експресије овог цитокина регистрован је у кожи старијих од 40 година, са значајно вишим степеном исказаним у фотоекспонираној кожи. Експозиција UV зрачењу може индуковати ангиогенезу и формирање нових крвних судова. Ово је остварено кроз виши ниво регулације (engl. Upregulation) индуктора ангиогенезе VEGF-a. Нижи ниво регулације (engl. Downregulation) има ангиогенетски инхибитор тромбоспондин-1 преко митогеном активираних протеин киназа (МАРК)/ екстрацелуларним сигналом регулисане киназе 1/2 (ERK1/2) (Ryan и сар. 2004).

Резултате сличне нашим саопштио је Amano (2008) који је показао да епидермис коже која је била изложена UVB зрачењу садржи повећану експресију VEGF-a, док је експресија антиангиогентског фактора тромбоспондина-1 (TSP-1) смањена. Ова неравнотежа индукује ангиогенезу у папиларном дермису, као и формирање бора. Amano (2008) такође закључује да инхибиција абнормалне ангиогенезе може бити моћно средство у борби против старења коже.

Ми смо у нашем истраживању регистровали да експресија VEGF-а има исту динамику промена и на фотекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Експресија се повећава у корелацији са узрастом почев од раног животног доба, са значајнијим повећањем после 40 година. Наиме, хоризонтална мрежа васкуларног плексуса остаје непромењена на кожи која је заштићена од сунца, док је нормална архитектура сигнификантно поремећена у фотооштећеној кожи. Промењено и оштећено везивно ткиво фотооштећене коже узрокује и дезорјентацију васкуларне мреже.

Yano и сар. (2004) године су објаснили механизам старења коже, узрокован UV зрачењем, кроз учешће ангиогенезе. Аутори наводе да акутно UVB зрачење коже доводи до епидермалне хиперплазије, повећања леукоцитне еластазе, последичним оштећењем мреже еластичних влакана и индукције ангиогенезе, коју прати пролиферација ендотелних ћелија у папиларном дермису. Аутори саопштавају да је UVB –зрачењем изазвана ангиогенеза повезана са up – регулацијом експресије VEGF-а и down- регулацијом експресије тромбоспондина - 1 (TSP1) у епидермису. Узети заједно, ови резултати указују на то да је UVB-ом изазвана ангиогенеза посредована штетним учешћем запаљенских ћелија и ангиогенетског „окидача“ који чини равнотежа експресије VEGF-а и TSP - 1 у епидермису (Yano и сар. 2004; 2005). Ови резултати су у складу са ранијим извештајима да акутно UVB узрокује експресију VEGF-а у хуманим кератиноцитима епидермиса *in vitro* (Brauchle и сар. 1996) и *in vivo* (Bielenberg и сар. 1998). Повећање евидентно указује да неколико фактора раста и цитокина, који посредују у епидермалној хиперплазији укључујући TGF- α , TGF- β , PDGF и KGF, могу деловати на повећање експресије гена за VEGF (Detmar и сар. 1995; Brauchle и сар. 1996; Gille и сар. 1997; Grunewald и сар. 2006).

У студијама на мишевима је показано да су оне јединке које прекомерно експримирају VEGF-A осетљивије на UVB зрачења од дивљег типа мишева. Такође је откривено, да претходна системска блокада VEGF-A смањује UVB зрачењем индуковану инфламацију, дилатацију васкуларне мреже и инхибицију ткивне репарације (Hirakawa и сар. 2005). У складу са овим налазима је и откриће да прекомерна експресија инхибитора ангиогенезе тромбоспондин-1 у епидермним кератиноцитима трансгених мишева (Tg) мишева, потенцијално превенира UVB-индукована оштећења (Yano и сар. 2002). Ови подаци наглашавају улогу ангиогенезе и васкуларне хиперпропустљивости у UVB-индукованим оштећењима коже (Huggenberger и Detmar 2011).

Хронична UVB експозиција коже мишева доводи до дилатације и повећане пермеабилности лимфних судова (Kajiya и сар. 2006). Поред тога, инхибиција лимфатичног ендотел специфичног VEGFR-3 моноклонским антителима сигнификантно пролонгира индуковани инфламаторни едем и ћелијску инфилтрацију који настају након UVB зрачења (Kajiya и Detmar, 2006), док активација VEGFR-3 редукује едем и инфламацију (Huggenberger и сар. 2011; Kajiya и сар. 2009). Овај налаз може објаснити повећану пропустљивост крвних судова, као и смањену функцију лимфне дренажа после излагања UVB зрачењу. Заједно, ови подаци указују да би инхибиција активације крвних судова/ангиогенезе или стимулација лимфне функције представљали нове приступе у спречавању фотостарења коже (Huggenberger и Detmar 2011).

Лучење VEGF-a је подстакнуто деловањем различитих цитокина и чиниоца раста, али и хипоксијом (Semenza, 2003). Код еритема који се јавља на кожи оболелих од *Rosacea*-е регистрована је хиперекспресија кератиноцитног VEGF-a, који ступа у интеракцију са рецепторима на површини ендотелних ћелија крвних судова, што доводи до ангиогенезе (Орасмјез и Глаголева, 2011; Huggenberger и Detmar 2011). И у студијама циклуса раста фоликула длаке Yano и сар. (2001) показано је да је за ангиогенезу потребна подршка и производња VEGF-a. Наиме, код косе која опада постоји нижи ниво регулације (downregulation) VEGF-a, а у исто време тромбоспондин-1 има виши ниво регулацију (upregulation) са снажном васкуларном инхибицијом. Повећање експресије VEGF-a везује се за многе инфламаторне болести укључујући хроничне упале дисајних путева, реуматоидни артритис, инфламаторну болест црева, артеросклерозу, као и хроничне инфламаторне болести коже, попут псоријазе (Bainbridge и сар. 2006; Baluk и сар. 2005; Danese и сар. 2006; Detmar и сар. 1994; Kanazawa и сар. 2001). На овај начин се може објаснити и умерено повећање VEGF-a које смо регистровали у фотонеекспонираној кожи, старијих од 40 година. Наиме, ми смо у нашем истраживању инспекцијом елиминисали оне узорке (кадавере) који су на кожи имали неку ефлоресценцу, а нисмо узимали у обзир хетероanamнезу са подацима о могућим претходним болестима.

Следи да је прогресивно смањење дермалне васкулатуре изражено, са морфолошке тачке гледишта, кроз смањење величине крвних судова и њихово прогресивно нумеричко смањење, обележје и хроно и фотостарења, а да је прогресивно повећање експресије VEGF примарно обележје фотостарења.

Прогресивно смањење колагена, у функцији старења, води прогресивном увећању празног простора који припада основној супстанци ЕЦМ-а. Екстрацелуларни матрикс узима учешће у формирању тзв. „ниша“ за ћелије дерма, које представљају одређене просторе са специфичним микрокружењем. Ови простори су важни за диференцијацију ћелија везивног ткива, налазе се у свим органима одраслих особа, па и кожи (Рукша и сар. 2013). Предавање сигнала ћелијама везивног ткива, регулација њихове пролиферације и способност миграције из „ниша“ омогућена је деловањем интегрина, за које се претпоставља да имају важну улогу у овим процесима (Stupack и Cheresch, 2002).

Старење представља динамичан процес који утиче на све системе. У кожи се знаци старења манифестују у виду бора и птозе, а представљају резултат структурних промена на молекуларном нивоу, у првом реду структуре међућелијског матрикса (Röck и Fischer, 2011).

У нашем истраживању, основну супстанцу екстрацелуларног матрикса дерма, смо детерминисали индиректно, на препаратима бојеним *HE* и *Van Gieson* техником, као празан простор који се не боји. Имали смо у виду да постојећа техничка решења у обради препарата могу резултовати нешто већим обимом ових простора, услед промене (скврчавање) ткива приликом фиксације, а који нису научно детерминисани као код неких ткива, па због тога ове резултате узимамо са неким нивом резерве. Такође смо, у програму *Image J*, одредили ВГ основне супстанце.

Хистолошком анализом, запазили смо да кожа новорођенчади и младих садржи мали простор који припада основној супстанци екстрацелуларног матрикса дерма. Оваква хистолошка организација остаје очувана и у средњем животном добу и на кожи врата и на кожи стомака. Гликозаминогликани су у здравој кожи дифузно распоређени у дерму између влакана колагена и главни су чинилац физиолошке хидратације коже (Silbert, 1993; Manuskiatti и Maibach, 1996). Упоредо са прогресијом смањења количине колагених влакана, која се почетно региструје у кожи позног животног доба, запажа се повећање простора који припада основној супстанци екстрацелуларног матрикса дерма, тако да је он обрнуто пропорционалан количини колагених влакана у дермису. Стереолошка студија коже показује да је ВГ основне супстанце екстрацелуларног матрикса дерма, најмања у кожи фетуса/беба, а највећа у групи најстаријих. Динамика промена величине простора који заузима основна супстанца екстрацелуларног матрикса има сличан ток и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Простор који припада основној супстанци се прогресивно

повећава са старењем, почев од групе раног животног доба, значајно више на фотоекспонираној, него на фотонеекспонираној кожи у свим животним добима, изузев новорођенчади.

Познато је да MMP 1 иницирају почетак деградације колагена тип I и III у дерму, који даље деградирају MMP2 и MMP9 (Kahari и Saarialho-Kere, 1997). Истовремено експресија MMP2, MMP3 и MMP9 доводи до деградације неколагених компоненти ЕЦМ-а, укључујући гликопротеине и протеогликане базалне мембране. У старој кожи матриксне металопроотеиназе су присутне у активнијој форми, поготово што је ниво ткивних инхибитора MMPs-а у таквој кожи снижен (Ashcroft и сар. 1997).

На појединим узорцима коже врата, позног и најстаријег животног доба, код којих се региструју конфлуентна запаљењска жаришта, на местима где се жаришта стапају, примећују се да су снопови колагена сведени на узане траке или мрежасте структуре, а да је простор који припада основној супстанци, повећан. И други истраживачи саопштавају да се у соларно оштећеној кожи детектује повећан садржај гликозаминогликана, а експериментални мишији модел актиничног оштећења коже потврђује стимулацијски утицај UV зрачења на синтезу и депозицију гликозаминогликана (Bernstein и Uitto, 1996; Kligman, 1996). Еластична влакна здравих особа садрже поред еластина и фибрилина велики протеогликан са хондроитин-сулфатом тзв. верзикан (Bernstein и сар. 1995; Zimmermann и сар. 1994). Количина верзикана значајно је повећана у деловима дерма захваћених соларном еластозом, а фибробласти изоловани из соларног оштећеног дерма садрже значајно више iRNK за верзикан у поређењу са здравом кожом (Bernstein и сар. 1995). Присуство верзикана у соларном еластозном материјалу може да објасни обилност гликозаминогликана у соларно оштећеној кожи с обзиром на то да верзикан припада породици протеина који везују хијалуронску киселину (Le Baron и сар. 1992; Manuskiatti и Maibach, 1996). Такође је показано да у првим сатима након UVB зрачења долази до благог снижавања количине хијалуронске киселине, а потом и до њеног повећања и активног обнављања у дерму (Averbeck и сар. 2007). Интересантно је да до повећане продукције хијалуронске киселине долази после једноструке, умерене дозе UVB зрачења, а да високе, понављајуће дозе доводе до инхибиције овог процеса (Kakizaki и сар. 2008). Због тога фотоостарела кожа садржи мање хијалуронске киселине него млада кожа (Sudel и сар. 2005).

Због напред изнетих ограничења везаних за методологију истраживања количине основне супстанце у дерму задржавамо се само на глобалној процени њеног

повећања у корелацији са старењем, које је израженије на фотекспонираној кожи, што је у складу са саопштењима осталих истраживача.

Узрасно старење је повезано са губитком еластичних влакана услед протеолитичке деградације, повезане са сниженом синтезом еластина у опуштеној, млохавој кожи. Супротно, при фотостарењу у средњем делу дерма се налазе масивни депозити еластина који су изгубили своје функционалне карактеристике (Fisher и сар. 2002).

Еластична влакна чине посебну врсту фибриларних протеина са специфичном структуром која је одређена присуством доминантне аморфне компоненте (еластина) и фибрина 1 и 2, гликопротеина који представљају главну компоненту микрофибрила (Abramović и сар. 2006). У нашем истраживању смо за идентификацију еластичних влакана користили хистохемијску методу модификованог Алдехид фуксин бојења тзв. Halmi модификацију методе Гомори, у којој се користи алдехид фуксин са лајт грином (light green) или наранџастом Г (orange G) као контрабојењем. Овим бојењем колаген и базална мембрана се боје зелено, а мастоцити, еластична влакана, као и пехарасте ћелије (слуз), љубичасто. Коришћењем поливалентне базне боје алцијан плаво (alcian blue) по методи Spicera којом смо детектовали мастоците, добро се боје и еластична влакна, па смо и овако обојене узорке користили за хистолошку анализу.

При анализи ткивних узорака праћен је начин организације еластичних влакана, њихова густина, дужина, дебљина, вијугавост, односно упоређивана је структура, организација и густина еластичних влакана између група. Такође смо, у програму *Image J* одредили њихову ВГ.

У кожи новорођенчади и младих, на врату и стомаку уочено је да еластична влакна формирају фину мрежу, уређене структуре, која остаје све до 40 година старости. Међутим, дискретне промене регистровали смо на 3 узорка коже врата, средњег животног доба, у виду фокалних накупина промењених еластичних влакана у ретикуларном дерму. У групи позног животног доба и групи најстаријих, на фотоекспонираној кожи, уочавају се видљивије промене, које постају све израженије са старењем.

Мишљења смо да у почетку постоји тенденција ка фрагментацији релативно малог броја еластичних влакана, како на нивоу папиларног, тако и на нивоу ретикуларног дермиса. Папиларни дермис губи фину мрежу еластичних влакана која се постепено проређује, а појављују се фрагментована влакна, смањеног афинитета за

боје, квантитативно мањег обима. Промене се јављају и у ретикуларном дермису где еластична влакна имају тенденцију ка постепеном згушњавању, а истовремено се евидентира и еластолиза, која је на почетку дискретна, али са старењем прогредира, тако да је видљива у готово свим узорцима најстаријих. Фрагментација еластичних влакана постаје све израженија током старења, а истовремено постоји и обимније задебљање еластичних влакана и то обе групе: и фрагментованих и оних који задржавају одређену фибриларну структуру. Запажа се акумулација дезорганизованог еластотичног материјала у ретикуларном дерму.

Запажање слично нашем износи и El-Domyati са сар. (2002). Они истичу да у фотоекспонираној кожи, долази до квантитативних и квалитативних промена у еластичним влакнима током старења. Аутори запажају да је постепена акумулација еластина, праћена постепеном редукцијом колагених влакана и закључују да подручја у којима је одсутан обојени колаген у дермису, изразито корелирају са местима запоседнутим еластотичним материјалом. У истој студији El-Domyati и сар. (2002) су показали да током старења долази до постепеног повећања интензитета бојења еластина у фотоекспонираној кожи и смањења интензитета бојења еластичних влакана у фотозаштићеној кожи. Слична запажања изнели су раније Bernstein и сар. (1996) указујући да је нормална активност дермних фибробласта да синтетишу еластин, узрок повећања еластичног ткива, али не и разлог за аберантну морфологију еластичног ткива. Попут колагена и еластина подлеже непрестаном процесу ремоделовања. Овај процес је знатно спорији, а кључни ензим у деградацији еластина је еластаза (West, 1994; Uitto и Christiano, 1993). Механизми који доводе до промена на еластичним влакнима још увек нису довољно проучени, али се зна да поред еластазе у њиховој деградацији могу учествовати и MMP-2 и MMP-12 (Fenske и Lober, 1986; Chung и сар. 2002).

У нашој студији смо запазили да се при фотостарењу јављају акумулације измењених еластичних влакана који заузимају различите делове дерма, а најчешће је то на граници папиларног и ретикуларног дерма. У препаратима коже са регије врата, особа позног и најстаријег животног доба, чак више од половине истраживаних узорака показивао је неке елементе умерене или изражене соларне еластоze. Ми смо у нашем стреолошком израчунавању утврдили да у фотоекспонираној кожи особа средњег, позног и најстаријег животног доба постоји статистички сигнификантна, већа количина еластичних влакана, у односу на фотонеекспонирану кожу ових група. И други аутори наводе да се при фотостарењу јављају акумулације измењених

еластичних влакана које заузимају различите делове дерма и које уствари репрезентују актиничну еластозу. Ове акумулације су обично на граници папиларног и ретикуларног дерма, а код узрасног старења их нема (Kligman, 1969; Tedesko и сар. 1997).

Акумулација абнормалних еластичних влакана на фотоекспонираној кожи била је документована у бројним истраживањима, укључујући Seite и сар. (2006) који су установили да након задебљања оштећаних делова еластичне мреже влакана и директне интеракције лизозима са еластазом, лизозим превенирана деградацију еластина, у механизму нормалне деградације са хуманом леукоцитном еластазом (HLE), редукују HLE протеолизу.

Соларна еластоza је специфична промена у дерму карактеристична за фотостарење коже, која се јавља након хроничне експозиције UV зрачењу (Mitchel, 1969). Примарна реакција еластичних влакана на дејство UV зрачења је њихова хиперплазија. У фотоостарелој кожи која је више пута, поновљено излагана зрачењу долази до настанка дегенеративних промена на еластичним влакнима, са последичним смањењем њихове еластичности и резистенције (Matsuoka и Uitto, 1989; Lavker и сар. 1995), као и формирања тзв. еластозног материјала (Ma и сар. 2001). Тада је у дерму присутна маса деградираних еластичних влакана у виду аморфног материјала који се састоји од неогранизованог тропоеластина и фибрилина (Yaar и Gilchrist, 2007) уз четвороструко повећање садржаја дезмозина (Bernstein и Uitto, 1996).

У стандардним пресецима коже са клиничким знацима хроничног соларног оштећења, бојеним на (HE), еластозни материјал се боји базофилније него иначе и не показује уобичајену фибриларну грађу (Marks, 1992; Gilchrist, 1996; Drake и сар. 1995). Еластозни материјал у дерму подсећа на „исецкане шпагете“ или је у виду хомогене, готово хрскавичаве масе (Marks, 1992) и редовно је одвојен од епидерма јасном „grenz“ зоном која садржи колаген, са или без вертикалних еластичних влакана. Ми смо на нашем истраживаном материјалу у свим узорцима који су имали знаке еластоze, такође регистровали „grenz“ зону.

У соларно оштећеној кожи, поремећен интегритет еластичне мреже у папиларном дерму, може настати и због смањеног садржаја и протеолизе фибрилина, гликопротеина који сачињава микрофибриле, потке за уградњу тропоеластина (Watson и сар. 1998). Такође је показано да фибробласти изоловани из актинично оштећене коже преписују четири пута више информацијске RNK за еластин, у

поређењу са фибробластима из коже неизлагане Сунцу. Узрок је повећање активности промотора гена за еластин (Bernstein и сар. 1994). Bernstein и сар. (1995) су на моделу трансгених мишева, испитивали утицај UVA и UVB зрака на активност хуманог промотора гена за еластин. Закључено је да појединачне дозе UVB и нешто мање UVA зрака повећавају активност промотора гена за еластин која траје 72, односно 48 часова. Понављана излагања изазивају кумулативни учинак. Дакле вишеструка излагања UV зрачењу могу да индукују соларну еластозу при чему испољавају адитиван ефекат. С обзиром на то да су UVB зраци делотворни и у *in vitro* условима, извесно је да је њихов утицај на дермне фибробласте непосредан, за разлику од UVA зрака који индукују повећање активности промотора еластинског гена посредно, вероватно активацијом кератиноцита, мастоцита или инфламацијских ћелија. У прилог овом закључку говоре налази Lavker и сар. (1995) да релативно мале количине UVA зрака, за разлику од сличне количине UVB, приликом понављане примене, изазивају запаљенске реакције у кожи.

Анализирајући узорке фотонеекспониране коже групе позног и најстаријег животног доба запазили смо, најпре дискретну фрагментацију еластичних влакана у папиларном дерму, која прогредира са старењем, док су у ретикуларном дерму влакна нормалне дебљине, изукрштана у свим правцима са благо сниженим афинитетом за боје. Нема накупина дебелих, испреплетаних влакана које представљају еластозни материјал. И други истраживачи саопштавају да са старењем у папиларном дермису долази до ишчезавања еластичног ткива (Семкин, 2001), с тим што се у ретикуларном слоју повећава број и ширина влакана, па они постају груби и фрагментовани. Прогресивна дегенерација еластичних влакана јавља се пре свега код хронолошког старења коже (Lavker и сар. 1989). Ови резултати су у складу и са студијом Uitto (2008) који је показао да током природног старења коже постоји јасна дегенерација мреже еластичних влакана. Слично запажање износе Bonta и сар. (2013) који су у својој хистолошкој студији узрасних промена структуре еластичних влакана коже, регистровали значајније структурне промене код особа старијих од 50 година, а то је наша група позног животног доба у којој су такође евидентиране значајне промене.

Резултате сличне нашим недавно су публиковали Abd El-Aal и сар. (2012) који су бојили и анализирали кожу леђа, као фотонеекспонирану регију, две старосне групе. Бојењем на Orcein идентификоване су промене еластичних влакана током старења. Танке, кратке и фрагментоване снопове имало је 63.6% старих. Умерено

задебљала влакна су уочена код 18.2% старих, а богата еластична влакна у папиларном и ретикуларном дермису нађена су у 18.2% старих испитаника. На другој страни код младе групе се види богата мрежа еластичних влакна у 87.7%, а умерено задебљала влакна у 13.3%. Танки, кратки, нејасни и фрагментовани снопови еластичних влакана нису пронађени ни код једног од младих субјеката.

Слично запажање износи и El-Domyati са сар. (2002) наглашавајући да у фотонеекспонираној кожи попречни слој еластичних влакана са годинама постаје тањи, уз значајно смањење количине еластина.

Анализирајући промене еластичних влакана у кожи, у корелацији са узрастом, Mazyala (2008) у својој студији није потврдио хипотезу да еластична влакна деградирају само на фотоекспонираној кожи. Наиме, он је утврдио да се еластична влакна смањују током старења и на фотонеекспонираној кожи, уз напомену да оваква детекција смањења количине еластичних влакана, представља недовољан доказ да су влакна објективно деградирана, већ да су потребне биохемијске технике да би се то доказало. Ово је делимично у складу са нашим истраживањем јер смо и ми детектовали прогресивно смањење еластичних влакана на фотонеекспонираној кожи, после 40 година, док смо на фотоекспонираној кожи, почев од овог узраста, утврдили њихово прогресивно повећање. Разлике су вероватно условљене тиме што је примењена различита методологија у истраживањима. Mazyala је радио квалитативну хистолошку евалуацију еластичне мреже, у корелацији са узрастом, а ми смо поред квалитативне користили и квантитативну стереолошку методу за одређивање волуменске густине еластичних влакана, што представља сигурно поузданију методу.

Нису сви аутори сагласни са ставом да са старењем долази до прогресивног губитка и дегенерације еластичних влакана. У студији Abd El-Aal и сар. (2012) корелација између узраста и дегенерације еластичних влакана није била статистички сигнификантна. Одсуство корелације се може приписати већем броју фактора: хормоналном, генетском, нутрицијском, који могу да утичу на брзину старења коже код појединаца (Farage и сар. 2008). Struck (1991) сугерише да и други егзогени фактори, попут имобилизације, активности и адаптивних механизма утичу на биомеханичка својства везивног ткива током старења. Такође је наглашено да снижење нивоа естрогена представља један од важнијих узрока старења. Ово тзв. хормонозависно старење има независан ток од фотостарења и исказује се истањивањем коже и деградацијом еластичних и колагених влакана (Марголина, 2001). Quaglini и сар. (1996) су анализирали еластична и колагена влакна коже и

нису уочили да после педесете године постоје разлике у структури и количини влакана између мушкараца и жена. То је у супротности са наводима Dong и сар. (2005) који истичу да током менопаузе, престанак продукције естрогена убрзава промене коже. Колаген и еластин учествују у чврстини и отпорности коже, а њихова дегенерација са старењем чини да кожа постаје осетљивија и добија стари изглед. Пад естрогена у поостменопаузи може убрзати старење код жена, у односу на мушкарце (Dong и сар. 2005).

Хистолошком студијом здраве коже Jurić-Lekić (1984), оба пола, старости од 20 до 66 година, са подручја главе, врата, трупа и удова (укупно 35 подручја), показано је да у распореду еластичних влакана постоје и регионалне разлике, као и да се рутинска хистолошка бојења еластичних влакана и светлосномикроскопски критеријуми за њихово разликовање, не могу користити за прецизну диференцијацију врсте еластичних влакана, већ да се могу са сигурношћу разликовати само на основу њихове ултраструктуре.

Иако у нашем истраживању нисмо водили рачуна о ова два критеријума, потпуној и регионалној дистрибуцији, мишљења смо да би за будућа истраживања било важно да се и они узму у обзир. Очигледно је да неусаглашеност резултата и ставова различитих истраживача, изискује потребу да се у даљим истраживањима сагледа већи број обележја и усагласи методологија будућих студија да би се дошло до коректних резултата, везаних за структуру и квантификацију еластичних влакана у корелацији са старењем и фотоекспонирањем коже.

Квантификација ћелија на микроскопским сликама се може урадити конвенционалним бројањем или аутоматском анализом дигиталне фотографије. Компјутерском анализом дигитализоване микроскопске слике се могу лоцирати, измерити, идентификовати и избројати објекти од интереса који су у видном пољу светлосног микроскопа (Castleman, 1998).

У нашем истраживању детекција мастоцита вршена је употребом више хистохемијских метода бојења: поливалентне базне боје алцијан плаво (Alcian blue), по методи Spicera, Giemsa методом и Toluidin blue техником бојења. Такође смо, за идентификацију мастоцита, посебно у кожи фетуса и новорођенчади, користили кисели Aldehyd fuchin. Колор сегментацијом у комбинацији са морфолошким операцијама обраде дигиталне слике у програму *ImageJ* аутоматски смо квантификовали мастоците обојене Giemsa методом бојења.

Резултати истраживања указују да су мастоцити распрострањени по читавом везиву дерма и то најчешће као појединачне ћелије, ређе у мањим групама испод епитела или у близини крвних судова. Морфометријским мерењем смо утврдили да се број мастоцита у дермису повећава у корелацији са узрастом, остаје на сличном нивоу до почетка старости, а онда се значајно смањује.

Gunin и сар. (2011) су такође показали да се број мастоцита у дермису повећава током живота што је вероватно последица инфламаторних процеса који се одигравају у дермису. Епидермалне ћелије и дермни фибробласти укључени су у инфламаторне процесе преко продукције регрутујућих фактора који привлаче леукоците. Леукоцити након активације ослобађају факторе којима привлаче друге леукоците, али и мастоците на место инфламације, па следи да је повећање броја мастоцита резултат претходних инфламација (Mimeault и Batra, 2010).

И други научници су демонстрирали повећање броја мастоцита у кожи у току старења (Enerback и Wingren, 1980; Nissinen и Panula, 1995; Hart и сар. 1999; Luo и сар. 2002), што се донекле уклапа у наш резултат, сем смањења које смо евидентирали у групи најстаријих. Резултат сличан нашем презентовали су Kim и сар. (2009) у студији која је истраживала промене броја мастоцита у хронолошком и фотостарењу, као и утицај ултравиолетног и инфрацрвеног зрачења на преваленцу мастоцита и експресију триптазе у људској кожи. Они су дошли до закључка да се и на фотоекспонираној и на фотнеекспонираној кожи број мастоцита смањује са старењем, као и да је број мастоцита на фотоекспонираној кожи сигнификантно већи у односу на фотнеекспонирану кожу. Истраживање је обухватило кожу особа старости 20-39 година, 40-59 година, 60-70 година и старијих од 80 година. Ми смо најближи овом резултату, јер смо у нашој студији регистровали сличну динамику промена броја мастоцита, и на кожи врата и на кожи стомака, са значајно већим бројем ћелија на фотоекспонираним регијама, почев од средњег животног доба. У нашем истраживању утврђено је да се број мастоцита значајно смањује код старијих од 60 година.

Поред Kim и сар. (2009) још неколико студија је известило да фотоекспонирана кожа садржи већи број мастоцита у односу на фотнеекспонирану кожу (Bhawan и сар. 1992; Bosset и сар. 2003). Наши резултати су у складу са овим резултатима, јер смо и ми у нашем истраживању пронашли да је број мастоцита у фотоекспонираној кожи старијих од 20 година, на сваком узорку био већи у односу на фотнеекспонирану кожу истог појединца. Такође смо показали и да се у групи

најстаријих број мастоцита значајно смањује. Једна од хистолошки заједничких карактеристика хронолошког и фотостарења је губитак или промена структурних компоненти везивног ткива, узрокован неравнотежом између синтезе и деградације екстрацелуларног матрикса (Chung, 2003; Baumann, 2009) у којој мастоцити имају значајно учешће.

Мастоцити везивног ткива имају дуг животни век и захтевају стем факторе за сопствени развој и преживљавање, које почиње у коштаном сржи, а завршава се матурацијом у ткивима. (Gurish и Boose, 2002). Продукција стем ћелијских фактора који регулишу формирање мастоцита повећава се са старењем (Hart и сар. 1999). Миграција и пролиферација мастоцита зависи од везивања за протеине екстрацелуларног матрикса, а мастоцити могу да уђу у ћелијски циклус, после одговарајуће стимулације, што може да допринесе ширењу мастоцитне популације (Galli, 2000).

Бројне студије сугеришу да стимулуси узроковани UV зрачењем регулишу бројност мастоцита у људској кожи. Очигледно је да UV зрачење има утицај на стимулацију мастоцита, с обзиром да је њихов број повећан на фотоекспонираној кожи. Да ли је овај утицај директан или индиректан, још увек се не зна. Kim и сар. (2009) сматрају да UV зрачење директно стимулише мастоците, иако механизам ове стимулације још увек није познат. Други истраживачи виде механизам деловања UV зрачења, кроз стимулацију кератиноцита и фибробласта, који отпуштају хемотактичке факторе и регрутују мастоците у ова подручја. Хемотактички фактори који стимулишу миграцију мастоцита су стем ћелијски фактор (Nilsson и сар. 1994), TGF- β фибробласта (Olsson и сар. 2000; Brenner и сар. 2005), VEGF кератиноцита (Gruber и сар. 1995; Kim и сар. 2006) и интерлеукин (IL)-8 из кератиноцита и фибробласта (Inamura и сар. 2002; Storey и сар. 2005). Међутим, механизми тих утицаја и даље нису довољно јасни, па су потребна даља истраживања да би се разумели молекуларни механизми активације мастоцита и миграције ћелија у фотоекспонирана подручја коже, као и њихов утицај на окружујуће ћелије и ткива (Gilfillan и Tkaczuk, 2006; Metz и сар. 2007; Caughey, 2007).

И сами мастоцити су укључени у изражену продукцију цитокина, који такође могу да утичу на патологију промена у фотооштећеној кожи. Механизми репарације зависе од цитокина и цитокинско рецепторских интеракција, а показано је да UV радијација повећава већину од ових цитокина (Kondo, 2000). Наиме, мастоцити су извор великог броја активних и токсичних компоненти, као што су металопроотеиназе,

химазе и триптазе, TNF- α и хистамин и имају улогу у инфламацији и терморегулацији (Iddamalgoda и сар. 2008). Мастоцити најпроминентније експримују MMPs, а како су ови ензими најодговорнији за деструкцију колагена, неоспорно је да се на основу тога може извући закључак о учешћу мастоцита у деструктивним процесима током хроничне упале код фотостарења. Деструктиван учинак може имати и IL-4 мастоцитног порекла, који усмерава имунски одговор у правцу продукције антитела (Sarchio и сар. 2012). Могуће је да са старењем, кожа постаје осетљивија, а инфламаторне реакције интензивније, зато што активирани леукоцити и мастоцити ослобађају токсичне продукте који оштећују ткиво (Simon и сар. 2010). Овако изражена инфламација доводи до озбиљне деструкције структуре коже и израженијих знакова старења. Такође је могуће да цитотоксични продукти мастоцита и других ћелија порекла костне сржи, који се налазе у дермису, имају улогу у смањењу броја фибробласта, које је у корелацији са старењем. Резултати актуелних истраживања подржавају запаљенску теорију старења коже, што чини мастоците, главним чиниоцем који учествује у оштећењу ткива и индукцији старења. С тога се предлаже, да мастоцити буду посматрани и као важан циљ *antiaging* терапије (Gunin и сар. 2011). Овај став подржава изнете податке који указују на пораст броја мастоцита у условима инфламације након UV зрачења, као и у различитим инфламаторним кожним обољењима (Iddamalgoda и сар. 2008).

Поред инфламаторних реакција у дермису у којима учествују, мастоцити су укључени и у регулацију микроциркулације. Кожа је подложна сталном деловању спољашњих фактора као што су промена температуре и влажности, а она сама има улогу у терморегулацији у организму и регулише промене у снабдевању крвљу (Kenney и Journeay, 2010). Постоје резултати који потврђују корелацију између густине мастоцита у ткивима и хиперемije, као и везе између повећане васкуларне пермеабилности и дегранулације мастоцита, праћене ослобађањем хистамина. Пошто мастоцити служе као важан извор хистамина, који се ослобађа током њихове дегранулације, повећање њиховог броја може се довести у везу са појачаним инфлуksom леукоцита у жариште запаљења (Sarchio и сар. 2012).

Hart и сар. 2000; 2002 су саопштили да постоји функционална веза у степену имуносупресије и броја мастоцита у дермису, индукованих UV зрачењем. Такође, постоји претпоставка да је део имуносупресивних промена које се виде у фотооштећеној кожи, настао управо деловањем сигналних молекула које луче мастоцити, што према савременим концептима може узроковати малигну

трансформацију епителних ћелија (Krtolica и Campisi, 2002). Поред тога, показано је да између броја мастоцита у дермису и степена осетљивости коже на штетно дејство UV зрачења постоји јасна функционална корелација и да је хиперплазија мастоцита у фотооштећеној кожи један од фактора који повећава ризик настанка карцинома базалних ћелија (Hart и сар. 2000; 2002). Ово су потврдили Smirnova и сар. (2005) који су истраживали морфологију мастоцита коже у подручју изложеном хроничном UV зрачењу и повезаног са фотооштећењима и базоцелуларним карциномом. Утврдили су да хронична UV оштећења воде ка хиперплазији мастоцита и активирању њихових синтетских и секреторних функција. Аутори закључују да хиперплазија и повећање неуроендокрине активности мастоцита повећавају ризик за настанак базоцелуларног карцинома.

Када је реч о патогенези фотостарења, мишљења смо да се улога макрофага не може заобићи. Макрофаги нису само ћелије способне да врше фагоцитозу, већ имају функцију ефекторских ћелија стеченог имунитета, важну улогу у зарастању рана, усклађивању ћелијских миграција, ремоделовању екстраћелијског матрикса и ангиогенези (Gordon, 2007). Макрофагна ћелијска популација је у уској вези са околним везивним ткивом дермиса преко медијатора и директних међућелијских контаката. Ткива и спољашњи стимулуси усмеравају диференцијацију резидентних макрофага и њихову ефекторску функцију којом одржавају хомеостазу дотичног ткива (Gordon, 2003).

Хронична инфламаторна обољења коже одликују се акумулацијом великог броја активираних макрофага. Макрофаги привлаче фибробласте у фокус упале, стимулишу пролиферацију ендотелних и глаткомишићних ћелија, формирање базалне мембране и образовање микроциркулације (Mirza и сар. 2009).

У нашем истраживању за детекцију макрофага коришћена су моноклонска антитела против гликопротеина CD68 који се експримује на плазмалеми ћелија моноцитно-макрофагне лозе.

Анализом истраживаног материјала може се закључити да су дистрибуција и процентуална заступљеност макрофага релативно уједначени у зрелој кожи. Кожа одраслих садржи значајно више макрофага у односу на кожу новорођенчади/фетуса. Групе средњег, позног и најстаријег животног доба и на врату и на стомаку имају сличан број макрофага/mm², у односу на рано животно доба, док је средњи број макрофага/mm² у групи средњег и позног животног доба, на кожи врата, статистички значајно већи у односу на кожу стомака. У хистолошкој анализи смо запазили да се

ове ћелије неретко виђају у непосредном контакту са епителном базалном ламином или међу сноповима колагених влакана, појединачно али и у групама. Такође смо запазили да се макрофаги у већем броју налазе у запаљенским инфилтратима, као и око себацеалних жлезда коже пубертетског и адолесцентског узраста. Повећан број макрофага у овим регијама се може довести у везу са потребом да се уклоне остаци разграђеног ЕЦМ-а или ткивног детритуса у случају запаљења. Повећан број макрофага у кожи врата, раног животног доба, око лојних жлезда, последица је присуства бактерије *Propionibacterium acnes* у фоликулима длаке. Велики број ових бактерија ствара липазе, протеазе, хијалуронидазе и хемотаксични фактор цитотаксин, а такође покрећу класични и алтернативни пут активације комплемента (Lalević-Vasić и сар. 2008). Урођени имунски одговор посредован је инфламаторним цитокинима, хемокинима и компонентама комплемента. У овом виду заштите организма ангажовани су између осталих ћелија урођеног имунитета и макрофаги, који врше фагоцитозу (Abbas и Lichtman 2003).

Интересантно је да постоји само једна студија која је пратила број макрофага у кожи после понављаног UV зрачења. Аутори саопштавају да нису детектовали ни једну ћелију у кожи, након озрачивања коже са 0.5 минималне еритемске дозе (MED) дневно, током 6 недеља, соларно стимулисаном радијацијом (SSR) (Lavker и сар. 1995). Могуће да се ова ћелијска популација може регрутовати у кожи само као одговор на еритемске дозе UV зрачења. Што се тиче утицаја UV зрачења на функцију макрофага мало се зна, осим да је након акутног UV зрачења фагоцитна активност ћелија у крви смањена (Leino и сар. 1999), док утицај понављане UV експозиције на овај параметар није описан. Уопште узевши, информације у вези утицаја UV зрачења на хумане макрофаге у кожи, у овом тренутку недостају јер се мали број студија бавио овом темом.

Они аутори који су се бавили овом проблематиком истичу да моноклеарне ћелије више инфилтрирају фотоекспонирану него фотонеекспонирану кожу. Имунохистохемијска анализа је показала повећан број мастоцита, макрофага, CD4⁺ Т лимфоцита у дермису фотоекспониране коже, као и CD1a⁺ дендритичних ћелија у епидермису фотоекспониране коже (Bosset и сар. 2003). Сматра се да су хронична соларна оштећења коже резултат поновљаних акутних оштећења и да је хронични инфилтрат траг понављаних циклуса леукоцитне инфилтрације после сваког излагања коже Сунцу (Bennett и сар. 2008). Ћелијску популацију која запоседа кожу 6-72 сата после UV зрачења чине мијелоидне моноцитне ћелије од којих се многе

диференцирају у активне макрофаге (Hammerberg и сар. 1994; Meunier и сар. 1995). Ове ћелије вероватно представљају крвну популацију новоинфилтрованих моноцитних ћелија чија се диференцијација пролазно зауставља у правцу дендритичних ћелија, са пратећим наглашавањем диференцијације ка макрофагима (Yoshida и сар. 1998; Takahara и сар. 2003). Макрофаги су главни извор имуносупресивног IL-10 и имају значајну улогу у UV индукованој имуносупресији и толеранцији (Hammerberg и сар. 1994). IL-12 је цитокин који производе дендритичне ћелије (деплетиране UV зрачењем), кључан за сазревање Th1 ћелија (Kang и сар. 1998) и индукцију контактне преосетљивости, а показано је да може обновити имунску функцију озрачених мишева (Schwarz и сар. 1996).

Истраживања на мишевима су показала да излагање мишева једнократној еритемској дози UVB зрачења или апликовање исте дозе током 5 дана смањује фагоцитну активност перитонеалних макрофага и њихову производњу IL-12. Такође се смањује и њихова активна производња кисеоника, значајна за убијање патогена (Jeevan и сар. 1995; Kasahara и сар. 2001). Презентовано је и да перитонеални макрофаги у експерименту са хроничним UVB зрачењем могу да подстакну развој тумора (Norbury и сар. 1977). McLoone и Norval (2005) су тестирали развој фотопротекције, озрачивањем животиња једном високом дозом соларно симулиране радијације (SSR) која је довољна да изазове супресију фагоцитне активности макрофага у претходно незрачених мишева и пратећим понављаним малим дозама. Саопшили су да се очекивана супресија фагоцитне активности перитонеалних макрофага није развила. Претпоставка је, да се као резултат понављањем UV зрачења код мишева развија фотоадаптивна и фотопротективна активност перитонеалних макрофага.

Yoshihisa и сар. (2014) су након студије на кожи мишева, саопшили да је деградација колагена и компоненти базалне мембране након деловања UVB зрачења посредована деловањем макрофагног фактора инхибиције миграције (MIF). MIF је изражен посебно у базалном слоју епидермиса коже (Shimizu и сар. 1996) и игра важну улогу у бројним инфламаторним обољењима коже (Hoi и сар. 2003; Foote и сар. 2004).

Познато је да макрофаги продукују слободне радикале кисеоника (Persson и сар. 2008), а такође, утичу на активност других ћелија и испољавају антитуморско дејство. Синтезом одређених ензима врше ремоделацију екстрацелуларног матрикса (Urmacher, 1997). Наиме показано је да плазмин који синтетизују остарели

фибробласти може да активише проеластазу коју секретују макрофаги, а крајњи резултат је повећана деструкција ванћелијског матрикса у дерму, стање које се редовно запажа у остарелој кожи (West, 1994). Матриксне металопротеиназе, које продукују макрофаги представљају потентне медијаторе ткивне деструкције (Steenport и сар. 2009). Интересантно је да већина ћелија које синтетишу MMPs, не одлажу ове ензиме у унутарћелијске депое, са изузетком појединих MMPs у неутрофилима, еозинофилима и макрофагима (Stricklin и Welgus 1983; Wilhelm и сар. 1987; Welgus и сар. 1990). MMP-12, хумана макрофагна металоеластаза, члан породице матриксних металопротеиназа је најактивнија MMP која деградира еластин (Shapiro и сар. 1993). Презентовано је да UV зрачење узрокује повећање експресије MMP-12 у људској кожи *in vivo*, вероватно захваљујући синтези макрофага и фибробласта (Chung и сар. 2002). Фотооштећена кожа показује значајно повећање MMP-12, посебно у зонама где се евидентира материјал соларне еластозе (Chung и сар. 2002). Повезаност MMP-12 са соларном еластозом указује да ова металопротеиназа има важну улогу у њеном развоју. Наиме, абнормална продукција тропоеластина у фибробластима и кератиноцитима, након акутног или хроничног UV зрачења и њихово депоновање и деградација различитим ензимима, попут MMP-12, може водити акумулацији еластозног материјала у фотооштећеној кожи. Такође, продукцијом проинфламаторних цитокина, првенствено интерлеукина IL-1 β , IL-17 и TNF- α , макрофаги стимулишу акцију целуларног имунитета, поспешујући инфламаторну каскаду, чиме индиректно могу допринети ткивној деструкцији (Abbas и Lichtman 2003).

Повећање броја макрофага на фотоекспонираној кожи вероватно је узроковано повећаном активацијом макрофага у циљу фагоцитозе апоптотичних ћелија, које су настале деловањем UV зрачења и покушају неутралисања ћелија коже које имају оксидоване површинске липиде, што неки аутори описују као CD36 препознавање. Макрофагна продукција IL-10 може ублажити инфламацију и спречити аутоимунитет који се више јавља код старијих особа (Yoshida и сар. 1998; Takahara и сар. 2003).

На основу презентованих закључака осталих истраживача, мишљења смо да већи број макрофага на фотоекспонираној кожи указује да број макрофага корелише са фотостарењем и последичним структурним променама, које се манифестују у кожи током овог процеса. Потребно је свакако наставити истраживања на овом пољу, да би се дошло до нових ставова и надоместила празнина у научним информацијама која сада постоји.

Мада је кожа као орган анатомски лоцирана на периферији организма, чак је и њен најповршнији део, епидермис, преко имунског одговора, тесно испреплетан са физиолошким и патолошким процесима у телу (Farage и сар. 2010).

Ћелије одговорне за покретање имунског одговора су дендритичне ћелије (Дћ). То су професионалне антиген-презентујуће које имају способност презентације антигена хелпер Т лимфоцитима преко МНС II молекула (Banchereau и сар. 2000). Познато је да прекурсори дендритичних ћелија циркулишу у крви и да су зреле ћелије присутне у готово свим органима људског тела (Banchereau и сар. 2000). Са морфофункционалног аспекта дендритичне ћелије могу се поделити на зреле и незреле. Незрелим дендритичним ћелијама припадају епителне Лангерхансове ћелије (Лћ), а зрелим везивоткивне ћелије, међу којима је део популације означен као интердигитантне ћелије, услед бројних интердигитација које исказују у контакту са околним ћелијама (Abbas и Lichtman 2003; Romani и сар. 2012).

У нашем истраживању за идентификацију Лангерхансових ћелија коришћено је анти-CD1a моноклонско антитело. На основу наших запажања можемо констатовати да се овим маркером врло ефикасно приказује морфологија Лангерхансових ћелија, тј. добро се боје и тело, и њихови продужци који се пружају у свим правцима.

На узорцима коже новорођенчади/фетуса и раног животног доба запазили смо да највише Лангерхансових ћелија има у спинозном слоју епитела, нешто мање у базалном, док се у суперфицијалном слоју ретко уочавају. На основу прегледаног материјала стекли смо утисак да су Лангерхансове ћелије у спинозном слоју епитела крупне и јако разгранате, док међу онима у базалном слоју има доста овалних ћелија без цитоплазматских изданака. Сличну дистрибуцију и морфолошке особине имају Лангерхансове ћелије које се региструју у епидермису коже средњег животног доба, без разлике у односу на фотоекспонираност. Групе позног и старијег животног доба имају нешто ситније Лангерхансове ћелије, са слабије приказаним продужетцима, нарочито на фотоекспонираним регијама.

Ми смо у нашем истраживању утврдили да динамика промена броја Лћ, у функцији времена, има сличан тренд смањења броја ћелија и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Наиме, након повећања броја Лћ, у кожи врата и стомака, особа старости до 20 година, долази до снижавања броја Лћ, у корелацији са узрастом, значајно више на фотоекспонираној кожи.

Резултате сличне нашим презентовала је Горелова (2010) наводећи да је број ЛТћ у кожи узраста од 49 до 55 година био 30% мањи, него код особа узраста 19 до 27 година, док се код особа старијих од 60 година, тај број снизио за два пута. Горелова је изнела и запажања слична нашим, везана за дистрибуцију и морфолошке варијације Лангерхансових ћелија. Нешто раније, Grewe (2001) саопштава да се густина Лангерхансових ћелија смањује на приближно пола у фотоекспонираној кожи, у односу на фотозаштићене зоне код старих особа, и у односу на младе. Аутор наводи да је смањење броја Лангерхансових ћелија обрнуто пропорционално интензитету фотооштећења, а прати га и релативно смањење Бирбекових гранула. Слично запажање имали су Delo и сар. (1981) који су показали статистички сигнификантно снижење броја Лангерхансових ћелија у актинички оштећеној кожи.

Квантификацију ЛТћ у кожи мишева вршили су Toews и сар. (1980). Према њиховим резултатима у епидерму озраченом ниским дозама UVB зрака смањен је број Лангерхансових ћелија на 50 ћелија/mm² у односу на 770/mm² колико је било код неозрачених мишева.

UV зраци продиру у епидерм и делимично у горње делове дерма. У оквиру имунског надзора коже, циљне ћелије на које делује UV зрачење су имунски компетентне ћелије (Romani и сар. 2006). Показано је да UVB зрачење и интрадермна примена цитокина TNF- α имају сличне ефекте на Лангерхансове ћелије епидерма (смањују густину ових ћелија и мењају њихов изглед) и да је TNF- α примарни медијатор ефеката UV-зрачења. Детаљним испитивањем промене густине Лангерхансових ћелија помоћу имуноелектронске микроскопије утврђено је да већина Лангерхансових ћелија остаје у кожи након UVB зрачења или примене TNF- α , али их је због смањене експресије карактеристичних фенотипских маркера, тешко или немогуће детектовати светлосном микроскопијом, што је указало на то да UVB зрачење заправо инхибише миграцију Лангерхансових ћелија из коже. TNF- α доводи до промена у цитоскелету Лангерхансових ћелија, услед чега долази до њихове пролазне имобилизације у кожи. (Vermeer и Streilein, 1990). Задржавање Лангерхансових ћелија у кожи под утицајем TNF- α продукovanог у одговору на UVB зрачење, сматра се механизмом који је у основи инхибиције индукцијске фазе реакције контактне преосетљивости (Mommmaas и сар. 1993).

Има доста студија које су се бавиле истраживањем ултраструктурних промена Лангерхансових ћелија у кожи током фотостарења. Grewe (2001) је описао морфолошке разлике међу Лангерхансовим ћелијама у хронолошком и фотостарењу,

наводећи да се у фотоекспонираној кожи, у базалном слоју епидермиса, уз фотооштећене вакуолизоване кератиноците налази већи број дегенерисаних Лангерхансових ћелија. Промењене ЛЋ имају мањи број цитоплазматских продужетака, што се вероватно одражава и на њихову функцију. Romani и сар. (2006) сугеришу да се утицај природног старења коже разликује од утицаја UV зрачења на Лангерхансове ћелије, иако се њихов број у епидерму смањује, како у току хронолошког, тако и у току фотостарења. Аутори закључују да Лангерхансове ћелије трпе атрофичне промене, имају мање дендрита и мање Бирбекових гранула, као и да ове морфолошке промене могу бити повезане са могућношћу развоја рака коже.

Ми смо у нашем истраживању запазили да се у базалном слоју епитела, без обзира на регију коже, могу видети углавном округле, заобљене Лангерхансове ћелије, што би могло значити да су то ћелије које су тек доспеле у епител и још увек нису развиле цитоплазматске протрузије, или су то пак ћелије које из виших слојева епитела мигрирају ка дерму, након хватања антигена. Округле, „заобљене“ ћелије, које немају продужетке могу се схватити као вид адаптације која омогућава олакшан пролазак кроз базалну ламину епитела (Marjanović, 2010) или пак, у случају коже особа старијег животног доба, као и фотоекспониране коже, то може значити атрофију и дегенерацију Лангерхансових ћелија.

Једна електронска микроскопска студија је такође показала необичну разлику у бројности, дистрибуцији и морфологији ЛЋ, између фотоекспониране и фотонеекспониране коже, сугеришући да има индикација да ЛЋ учествују у процесу фотостарења коже (Toyoda и Bhawan, 1997). Знатно раније слична запажања имали су Thiers и сар. (1984) који су радили хистохемијску студију карактеристика Лангерхансових ћелија у кожи, уз коришћење маркера аденозинтрифосфатазне активности (АТР-аза+) коју исказују ове ћелије. Утврђено је да је број АТР-аза+ ћелија био значајно смањен у кожи старијих особа, као и да су та смањења више изражена на фотоекспонираним регијама. Ове регионалне разлике нису регистроване у кожи младих. Аутори су такође евидентирали и морфолошке алтерације у АТР-аза+ ћелијама, фотоекспониране коже старијих особа. Иако механизми ових промена нису до краја расветљени, цитокини који утичу на вијабилност, број, функцију и морфологију ЛЋ могли би бити укључени у тај механизам. Због тога микроокружење цитокина у актинички оштећеном епидермису у погледу присуства и концентрације GM-CSF, IL-6, IL-1, TNF- α и MCP-1 (engl. Monocyte chemoattractant protein-1) може бити важан фактор у алтерацијама примећеним у ЛЋ (Kondo, 2000). Ипак, поставља

се питање да ли су промене Лангерхансових ћелија последица процеса старења и деловања UV зрачења или су њихове промене један од чинилаца који те процесе модификује. Смањен број Лангерхансових ћелија може се схватити као адаптациони феномен којим се избегава претерана стимулација имунокомпетентних ћелија коже. Са друге стране, могуће је да улогу антиген-презентујућих ћелија у кожи преузимају друге ћелије способне за приказивање антигена, првенствено макрофаги, чији број постаје нешто већи са напредовањем процеса. Ова могућност је утолико вероватнија, уколико је епител тањи, веза између епидерма и дерма слабија, те антигени лако пролазе у везивно ткиво без задржавања у епидермису (Farage и сар. 2010). У сваком случају, неопходна су даља истраживања којима би се боље расветлила улога Лангерхансових ћелија у патогенези хроно и фотостарења коже.

Зреле дендритичне ћелије (Дћ) су професионалне антиген-презентујуће ћелије које разграђују антигене на пептиде и презентују их Т-лимфоцитима (Banchereau и сар. 2000). У нашем истраживању за идентификацију зрелих Дћ коришћена су поликлонска антитела за мултифункционални протеин S-100, који поред зрелих дендритичних ћелија у кожи маркира Лангерхансове ћелије, меланоците, Шванове ћелије и макрофаге (Marenholz и сар. 2004). Лангерхансове ћелије и меланоцити налазе се искључиво у епителу, па смо их искључили при квантитативној евалуацији зрелих дендритичних ћелија, које се налазе у дерму. И Шванове ћелије се могу поуздано и без потешкоћа искључити јер се увек налазе у склопу нерава. Пошто при квантификавању имунореактивних ћелија на S-100 протеин у дерму остају две ћелијске популације - макрофаги и зреле дендритичне ћелије, до укупног броја зрелих дендритичних ћелија дошли смо индиректно, одузимањем броја CD68+ ћелија, како су претходно били маркирани макрофаги, од броја S-100+ ћелија.

Ми смо у нашем истраживању утврдили да је средњи број дендритичних ћелија/mm² у кожи одраслих значајно већи у односу на кожу врата и стомака новорођене деце. Највећи средњи број дендритичних ћелија/mm² у кожи врата и стомака евидентиран је у групи средњег животног доба. На фотоекспонираној кожи, овај ниво ћелијске популације се задржава све до 60 година, када почиње значајно да се смањује. Фотоекспонирана кожа средњег и позног животног има већи број дендритичних ћелија/mm² у односу на фотонеекспонирану кожу. Ово је у складу са другим истраживањима која евидентирају повећање дендритичних ћелија у корелацији са UV зрачењем, као и њихово смањење у корелацији са старењем (Agrawal и Gupta, 2011). Повећање дендритичних ћелија се може схватити као

одговор на појачани прилив антигена преко фотооштећене коже, мада Zaba и сар. (2009) сматрају да се одређени субсетови дендритичних ћелија налазе управо у неинфламираној кожи. Иmunски систем коже, поред заштите од утицаја патогена и алергена има функцију заштите од траума, укључујући UV зрачење (Ochoa и сар. 2008).

У нашој студији смо уочили да се дендритичне ћелије налазе у папиларном и горњим слојевима дерма, а слично запажање саопштавају Zaba и сар. 2007. Бројне студије су утврдиле позитивну корелацију повећања броја дендритичних ћелија и UV зрачења. Narbutt и сар. (2004) презентују да су након тридесетодневног озрачивања целог тела волонтера, суберитемским дозама соларно симулиране радијације (SSR) индуковали повећање процента дендритичних ћелија, моноклеарне популације периферне крви, посебно мијелоидног подтипа 1. Leon и сар. (2009) су у студији која је анализирала дистрибуцију мастоцита и дендритичних ћелија, базоцелуларног карцинома коже, преко имунохистохемијских маркера CD117 и S100 протеина, регистровали присуство имунопозитивности на S100 протеин у 17 од 20 истраживаних узорака BCC. Yin и сар. (2014) су истражујући улогу хемерина (недавно идентификовани хемоатрактант за плазмоцитне дендритичне ћелија) утврдили да UVB зрачење индукује брз али пролазни инфлукс дендритичних ћелија, као и перзистентну инфилтрацију неутрофила и макрофага у кожи миша.

Резултате сличне нашим презентовали су Heier и сар. (2011) у студији која је пратила ефекте UV зрачења на дендритичне ћелије и макрофаге коже *in vivo*, пацијената оболелих од псоријазе. Аутори наводе да нису регистровали редукцију дендритичних ћелија после експозиције UV зрачењу, на регијама нормалне коже, оболелих од псоријазе.

Интересантно је да су Chung-Ching и сар. (2011) имали супротан закључак. Они су саопштили да неки облици конвенционалне анти-псоријатичне терапије код које се употребљава зрачење (PUVA, UVB и циклоспорин) корелишу са значајним смањењем броја дендритичних ћелија и/или експресије проинфламаторних медијатора који су продукти дендритичних ћелија попут iNOS, TNF, IL12 у псоријатичној кожи. И студија Sandvik и сар. (2014) која се бавила истраживањем броја дендритичних ћелија у кожи болесника после реналне трансплантације, а који су на имуносупресивној терапији, утврдила је да је број дендритичних ћелија био сигнификантно редукован, у поређењу са контролом.

Нешто већи апсолутни број ћелија који смо ми регистровали у овом истраживању може се повезати и са самом методологијом аутоматског израчунавања броја ћелија у програму *ImageJ*. Квантификацијом уз помоћ софтверске анализе дигиталних слика, издвајање објеката од интереса се остварује са грешком од око 2,5% - 30%, зависно од висине прага трешхолдинга. Због неуједначеног бојења у подручју ћелије, низак ниво прага (узак опсег спектра и мали интензитет) неће издвојити све пикселе, унутар обојене ћелије, па ће једна ћелија бити раздељена у више објеката, што резултује погрешним бројањем. Такође, узимањем високог прага за трешхолд биће издвојени и пиксели који не припадају анализираној ћелији, па за резултат имамо и објекте који нису анализирани ћелије и вишак у резултату (Hughes и Culloch, 1991; Ruifrok 1997).

У сваком случају на ову тему су неопходна даља истраживања.

Једно од значајних питања којима се наука и данас бави јесте значај меланина у фотопротекцији коже од штетног дејства UV зрачења. О утицају UV експозиције на редистрибуцију меланина у епидермису зна се одавно (Tadokoro и сар. 2005). Традиционално се верује да је пигментација коже главни фотопротективни чинилац, с обзиром на то да меланин осим апсорпције UV зрачења има и антиоксидантна својства. У прилог тој тези иде и нижа инциденца малигних тумора коже код особа тамне пути. Међутим, подаци из литературе указују на то да је ова релација између пигментације и фотопротекције много комплекснија него што се то мислило (Astner и Anderson, 2004).

Идентификација меланина у епидермису може да се врши рутинским техникама бојења, као што су *HE*, *Toluidine blue* и *Nile blue* бојење, које нису поуздане методе и хистолошким техникама које служе искључиво за идентификацију и описивање меланина и меланоцита (Churukian, 2002), као што су Fontana-Masson бојење сребром (Barbosa и сар. 1984) и ензимска DOPA реакција (Sasai и сар. 1978). Ми смо у нашем истраживању користили Fontana-Masson бојење за идентификацију меланина и имунохистохемијско бојење на S-100 протеин за идентификацију меланоцита у епидермису. Меланоците смо квантификовали посредно одузимањем од укупног броја S-100+ ћелија, број CD1+ ћелија, којима смо идентификовали Лангерхансове ћелије.

Епидермни меланоцити су дугоживеће ћелије, док су меланоцити у фоликулима длаке, ћелије које живе онолико дуго колики је и циклус раста длаке (просечно 3 до 5 година) (Tobin, 2011). Пролиферација и диференцијација

меланоцита, током развоја, регулисана је од стране бројних генетских и епигенетских фактора, продуката кератиноцита, фибробласта, меланоцита, ендокриних жлезда и фактора окружења (попут UV радијације) (Hirobe, 2011).

Ми смо у нашој студији утврдили да број меланоцита у епидермису коже врата корелише са узрастом. Повећава се до средњег животног доба, на том нивоу остаје до 60 година, када се значајно смањује. На кожи стомака број меланоцита се повећава у раном животној добу, остаје на том нивоу и у средњем, а потом почиње да се значајно смањује код старијих од 40 година. Такође смо регистровали значајно већи број меланоцита на фотоекспонираној кожи средњег и позног животног доба, у односу на фотонеекспонирану кожу.

Ови резултати су у складу са резултатима Whiteman и сар. (1999), који су показали да после 30. године 10 до 20% епидермних меланоцита нестаје током сваке декаде живота. Аутори су такође нагласили да густина меланоцита у кожи зависи од окружења (углавном UV радијације) и фактора које секретују кератиноцити и фибробласти. До истог закључка дошли су Gilchrest и сар. (1979) који су такође показала да се после 30. године количине пигментних ћелија у епидермису смањује. Много раније Cochran (1970) је у студији која је истраживала број меланоцита у базалном слоју епидермиса коже главе, оба пола, презентовао да број меланоцита у кожи корелише са узрастом и да се са 3,7 %, колико их има у епидермису коже фетуса повећава на ниво од 10,1 % код одраслих. Резултате сличне нашим саопштили су Ноздрин и сар. (2011). Аутори су након сопственог истраживања закључили да снижавање количине меланоцита почиње у групи узраста 26–30 година, а да се најизраженије смањење меланоцита евидентира у групи старости 31–40 година. Ми смо у нашем истраживању значајно смањење меланоцита у фотонеекспонираној кожи евидентирали у групи старости 41-60 година, а на фотоекспонираној код старијих од 60 година. Наша група средњег животног доба има просечну старост од $33,1 \pm 4.95$ године, па је и логично да у овој групи нисмо могли евидентирати значајније смањење броја меланоцита. Разлике се могу приписати и различитим регионима коже који су истраживани, као и примени различите методологије за квантификацију меланоцита. Њихово истраживање је истраживало интерфоликуларну регију коже лица мушкараца употребом тирозиназе за идентификацију меланоцита, а ми смо до броја меланоцита дошли посредно, одузимајући од укупног броја S100+ ћелија број Лангерхансових ћелија.

Међутим, има и истраживања, попут Кичигина (2007) које није потврдило узрасно смањење броја меланоцита.

Познато је да густина меланоцита у људском епидерму варира у зависности од региона тела (Szabo, 1967). Whiteman и сар. (1999) спекулисали су да би ове разлике могле бити унапред одређене, а Fallowfield и сар. (1991) разлику приписују изложености коже деловању Сунчевог зрачења, прецизирајући да је дошло до двоструког повећања броја меланоцита на кожи која је изложена Сунцу у поређењу са неизложеном кожом, што смо и ми регистровали на кожи позног животног доба. Недавно су и Madden и сар. (2011) саопштили да густина меланоцита зависи од анатомске регије коже и степена оштећења које узрокује Сунчево зрачење.

Hendi и сар. (2011) су у мултицентричној компаративној студији истраживали густину и дистрибуцију меланоцита на неоштећеној, фотоекспонираној кожи главе и врата. Узорци коже бојени су *HE* и *Melan-A* бојењем. Резултати за *HE* бојење су $9,3 \pm 3,7$ меланоцита на 0,5 mm фотоекспониране коже и за *Melan-A*, $12,0 \pm 4,8$ меланоцита на 0,5 mm фотоекспониране коже. Ми смо у нашој студији регистровали већи апсолутни број меланоцита, што је вероватно узроковано већ поменутим аутоматским бројањем у програму *ImageJ* и могућим већим нивоом грешке од субјективног бројања.

Има студија које су се бавиле морфологијом меланоцита у корелацији са старењем. Презентовано је да се код старијих особа, независно од смањеног броја меланоцита, мења и њихова морфологија (постају већи, са више наставка), док је активност тирозиназе смањена (Yamaguchi и сар. 2007; Tobin, 2011; Kauser и сар. 2011). Arck и сар. (2006) саопштавају да меланоцити старих људи показују дегенеративне промене, које су резултат деловања оксидационог стреса.

Разматрана је и веза између старења и пролиферативне активности меланоцита. У *In vitro* студијама показано је да адултни меланоцити пролиферишу мањом фреквенцијом него фетални и неонатални (Bennet и Medrano, 2002). Такође, меланоцити пацијената са прематурним старењем имају смањен пролиферативни потенцијал. Пролиферативни потенцијал терминално диферентованих меланоцита је инхибиран променама контроле ћелијског циклуса нпр. акумулацијом инхибитора циклин зависне киназе ($p27^{Kip1}$, $p16^{INK4a}$ и $p21^{Cip1}$), хипофосфорилацијом pRB (engl. retinoblastoma protein) и смањењем нивоа циклина D1 (Rizos и сар. 2004; Bennet и Medrano, 2002). Поред тога разлог смањеног броја меланоцита је апоптоза терминално диферентованих ћелија. Изгледа да су акумулација ROS-a, као

последица смањеног садржаја и активности каталазе и смањење регулације Bcl-2, главни индуктори апоптозе (Rizos и сар. 2004; Kauser и сар. 2011). Преолиферација меланоцита регулисана је и преко митогеном активираних протеин киназа (МАРК), коју стимулишу различити фактори раста. Код терминално диферентованих меланоцита овај главни пролиферативни пут није активан (Rizos и сар. 2004). Открића молекуларне регулације пролиферације и смрти меланоцита помажу у разумевању поремећаја, попут меланома и витилига (Imokawa, 2004; Misterska и сар. 2009).

Уочено је да продукти настали оштећењем ДНК под дејством UV зрачења стимулишу меланогенезу (Eller и сар. 1996). Такође се зна да UV експозиција повећава ингестију меланозома од стране кератиноцита (Virador, 2002). Након UV зрачења, оштећење ДНК настаје одмах, а индукција интрацелуларних сигнала попут NFκB и p53, неколико минута касније. Индукција меланозомских протеина се појављује после неколико сати, а пролиферација меланоцита се повећава унутар једне недеље, док се пораст густине меланоцита запажа касније. Такође је познато да се редистрибуција меланина према површини коже уочава унутар једне недеље после деловања UV зрачења. Пошто се садржај меланина у базалним слојевима смањује настаје нова синтеза меланина. Нормални турнус за постојећи меланин у базалном слоју, његова миграција према површини коже и нестанак преко десквамације је око 4 недеље (Levine, 1993; Nordlund и сар. 1998). У студијама *in vitro* је добијено увећање садржаја меланина седам пута након што је ћелија третирана тимидин динуклеотидима, малим фрагментима ДНК, који могу да настану као резултат дејства UV зрачења (Eller и сар. 1996). Ослобађање цитокина, фактора раста и проинфламаторних липида попут леукотријена и PGE2 (Yamaguchi и Hearing 2009) може да повећа продукцију меланина у меланоцитима и/ или стимулишу трансфер меланина ка кератиноцитима. Код старијих, хронична инфламација повезана са старењем повећава склоност ка појави тамних мрља на кожи (*lentigines*)(Goyarts и сар. 2007). Овај козметски феномен погађа више од 90% особа старијих од 50 година (Brenner и Hearing, 2008).

У нашем истраживању уочава се да је концентрација меланина већа у кожи врата у односу на кожу стомака, што је потврђено квантификацијом меланина у *ImageJ* програму, уз помоћ сегментације пиксела еквивалентних количини меланина на изабраној површини слике. Меланин је у форми меланинских капа распоређен у базалном слоју кератиноцита, а на неким узорцима и у спинозном и гранулозном

слоју епидермиса. Вероватно да у зависности од количине и дужине инсолације, долази и до различите заступљености меланина у епидермису.

Подаци из литературе указују да при хронолошком старењу поједине ћелије епидермиса могу садржати значајне количине меланозоских комплекса, док друге могу бити лишене меланинског пигмента (Алексеев и сар. 2009; Алексеев 2011). Слично запажање смо имали и ми, посебно на фотоекспонираној кожи старијег животног доба.

Податке сличне нашим презентовали су Miot и сар. (2012). Они су квантификацијом меланина одредили ниво од 4793 pixels у базалном, спинозном и гранулозном слоју здраве коже, а ниво од 76803 pixels меланина у кожи на којој је евидентирана пигментна промена (мелазма), уз препоруку да се ова методологија користи за идентификацију пигментних промена. Највећа вредност у нашем истраживању забележена је на фотоекспонираној кожи групе позног животног доба и износи 6358 pixels. Carriel и сар. 2011. такође дају препоруку да се за идентификацију меланина може користити одређивање интензитета пиксела употребом *ImageJ* програма, мада констатују да метода није специфичнија и осетљивија него што је класична идентификација меланина.

Ми смо у нашем истраживању утврдили да динамика промена количине меланина има сличан ток на фотоекспонираној и фотонеекспонираној кожи. Након узрасног повећања, смањује се са старењем. Такође смо регистровали да значајно већи садржај меланина има фотоекспонирана кожа, почев од средњег животног доба.

При хроничној инсолацији базална мембрана се згушњава при чему се дуж ње запажа различита количина накупина пигмента меланина, уз значајан пораст броја самих меланоцита (Gilchrest, 1979). Заправо, три потенцијална механизма би могла објаснити тамњење коже након UV експозиције. То су редистрибуција постојећег меланина према површини коже, промене форме и интрацелуларне локализације меланина (унутар супрануклеусних меланинских капа) и/или синтеза новог меланина (Tadokoro и сар. 2005).

Middelkamp-Hup и сар (2006) су истраживали применљивост конфокалног микроскопа RCM (engl. Reflectance Confocal Microscopy) за детекцију UV зрачењем индукованих пигментних промена на животињском моделу свиње (guinea pigs). Животиње се зрачене соларно симулираном радијацијом током 7 дана, а компарацијом незрачене и зрачене коже запажено је повећање величине меланоцита, повећање броја дендритичних наставка и самог броја меланоцита, као и повећање

количине пигмента меланина у кератиноцитима, у озраченом епидермису. Интересантно је да ове промене могу да се открију чак и пре клинички видљивог тамњења коже. Међутим, у другој студији са моделом (guinea pigs) која је испитивала однос између протективне улоге меланина и UV зрачења, нису утврдили разлику у пигментованој и непигментованој кожи, у односу на било коју дозу зрачења. Закључили су да меланин не штити значајно DNA кератиноцита од UV радијације (Ishikawa и сар. 1984).

Друге су се студије усмериле на однос факултативне пигментације и фотопротекције. Young и сар. (1988) су појединце (кожни тип II), третирали са заштитним фотопротективним кремама и излагали зрачењу у соларијуму. Резултати мерења садржаја меланина, дистрибуције и дебљине коже узете на крају експеримента, довели су до закључка да повећани садржај меланина, сам без заштитне креме није био довољан да спречи оштећења DNK. У наставку студије Young и сар. (1991) су утврдили да су пигментација и задебљање коже индуковани у кожним типовима од I до IV.

Мишљења смо да са старењем меланоцитни систем коже трпи комплексне морфофункционалне промене које се тичу заступљености, грађе и функционалне активности меланоцита у епидермису. Ова активност се односи и на продукт меланогенезе меланин. Промене су далеко израженије на фотоекспонираној кожи што значи да хронична инсолација има значајан утицај на сваки од поменутих фактора.

У нашем истраживању, на класичном *HE* хистолошком бојењу, примећено је, да се са старењем (кожа позног и најстаријег животног доба) долази до смањења броја фибробласта. Такође смо запазили да се повећава број фиброцита, синтетски неактивних ћелија, у односу на фибробласте, синтетски активне ћелије. Смањење броја фибробласта посебно је евидентно на фотоекспонираној кожи групе позног и најстаријег животног доба, мада се на неким узорцима ових група може регистровати и њихово веће присуство, што се може схватити као реактивна појава у циљу надокнаде редукованог колагена. Међутим, никако се не може искључити могућност да њихова активност није усмерена ка синтези, већ више ка разградњи колагена (West, 1994).

Резултате сличне нашим презентовали су Gunin и сар. (2011) који су радили истраживање броја фибробласта у корелацији са старењем на пресецима коже обојеним *HE* методом. Идентификација фибробласта је вршена на основу њихове специфичне морфологије: издуженог једра и мале количине цитоплазме, а пошто ово

нису били параметри који су омогућавали прецизну идентификацију ћелије су означене као „фибробластима сличне“. Презентовали су да се број „фибробластима сличних“ ћелија смањује са старосном прогресијом.

Сличне резултате, нешто раније саопштава Mazyala (2008) који је радећи хистолошку студију дермних фибробласта у корелацији са узрастом установио да са старењем долази до смањења броја фибробласта у дерму. Смањење броја фибробласта у функцији старења доста раније описано је и од стране других истраживача (Montagna, 1990; Gilchrest и сар. 1982).

Фибробласти су убиквитарне ћелије у телу човека (Abraham, 2002; Leeson и сар. 1988), чија је функција везана за морфогенезу и динамично преуређење везивних ткива (Sorrell и Caplan, 2004). Они, не само да учествују у синтези фактора раста, цитокина, хемокина, матриксних металопротеиназа, продукцији и организацији међућелијске супстанце дерма, већ и у међућелијским комуникацијама са свим ћелијама коже (Шехтер и Берченко, 1978; Байрейтер и сар. 1995; Kahari и Saarialho-Kere, 1997; Stephens и Genever, 2007). Дермни фибробласти граде две „нише“: физичку (ЕЦМ), неопходну за функционисање ћелија дерма и биохемијску, посредством које регулишу раст, диференцијацију и функционисање ћелија дерма. Ове ћелије продукују све компоненте ЕЦМ-а као и специфичне ензиме за његово разлагање попут колагеназа и еластаза (Lorenz и сар. 2008).

Процес преуређења (ремоделовања) подразумева деструкцијску фазу и бластни стадијум, а фибробласти исказују најмање два фенотипа, у зависности од природе сигнала које примају из околине (West, 1994). У стању мировања фибробласти се само повремено деле и синтетизују мале количине протеолизних ензима, док у одговору на бројне стимулусе мењају свој фенотип (фаза активације) улазе у ћелијски циклус и повећавају продукцију протеолизних ензима (West, 1994; Uitto, 1993). Познато је да активирани фибробласти имају колагенолизни потенцијал јер продукују матриксне металопротеиназе (MMPs), посебно MMP-1, MMP-2, MMP-3 и MMP-9 (Fisher и сар. 1996; 1997; Rittie и сар. 2002; Chung и сар. 2001; Yag и сар. 2007). Колагеназа је кључни ензим у деградацији колагена који започиње његову дигестију тако да молекула колагена „одмотан“ њеним деловањем даље разара ензим желатиназа (West, 1994; Uitto, 1993; Goldberg, 1986). Продукција проинфламаторних цитокина (TNF)- α , IL-1, IL-6, и IL-8 (Basile и сар. 2003) од стране кератиноцита, привлачи полиморфно-нуклеарне леукоците и макрофаге (Pourzand и Tytgrell, 1999; Reelfs и сар. 2004), који су додатни извор MMPs-а. Из леукоцита се ослобађа MMP-8 која такође учествује у

протеолизи колагена (Fisher и сар. 2001; Rijken и сар. 2005; Hernandez-Pigeon и сар. 2006). Неоспорно је да густина фибробласта негативно корелише са степеном деструкције колагена, али њихов број увек може бити довољно велики да активно учествује у деградацији матрикса (Lorenz и сар. 2008).

Имајући у виду централну улогу фибробласта у одржавању интегритета дерма и чињеницу да се у току процеса старења најважније промене одигравају управо у овом сегменту коже, логично је претпоставити да је старење на неки начин повезано са функцијом ових ћелија.

Кључно откриће су још 1961. године објавили Hayflick и Moorhead са закључком да фибробласти везивног ткива имају ограничену способност ћелијске деобе (West, 1994). Утврђено је да су бројне функционалне карактеристике фибробласта промењене са старењем. Те карактеристике чине скуп узрасно- зависних промена које воде смањеном броју фибробласта и њиховог пролиферативног капацитета (Fisher и сар. 2008; Varani и сар. 2006; Simpson и сар. 2010). Међутим, узрок смањења броја фибробласта у дермису током старења још увек није откривен, иако је то вероватно и најважнија промена која је узрокована старењем у кожи.

У студији Gago и сар. (2009) презентована је старосно-зависна деплација прогениторних ћелија коже. Анализирајући функционални капацитет фибробласта коже, од пренаталног периода до пуне старости, Prives (2008) саопштава да се број фибробласта који су у ћелијском циклусу смањује са старењем. Нешто раније, до сличног закључка да са старашћу долази до смањења пролиферације фибробласта дошли су и други истраживачи (Pablos и сар. 1997; Pendergrass и сар. 1999). Goukassian и сар. (2000) су такође саопштили да је садржај PCNA+ ћелија (engl. Proliferating cell nuclear antigen) у култури дермних фибробласта био смањен, у корелацији са старењем.

Показано је да се и други функционални маркери дермних фибробласта (Ki-67, p53, p21) мењају са старењем (Goukassian и сар. 2000; Ma и сар. 2003), па смањење количине фибробласта може бити узроковано мањом брзином њихове обнове или успореном диференцијацијом из прогенитора (Zouboulis и сар. 2008; Naru и сар. 2009), али и резултат започињања апоптозе (Kim и сар. 2009; Alikhani и сар. 2005).

Дермни фибробласти се карактеришу експресијом мезенхимских маркера (CD90, CD73, CD105, CD44, vimentin) и одсуством епителних, хемопоезних и ендотелних маркера (Sorrell и Caplan 2009; Бозо и сар. 2010). Без обзира на то што фибробласти дерма експримују више различитих ћелијских антигена, ни један од њих

није ексклузивни маркер за ову ћелијску популацију (Ishida и сар. 2009; Lorenz и сар. 2008).

Ми смо у нашем истраживању, за маркирање фибробласта користили имунохистохемијско бојење на виментин, а анализирали смо промене у густини и бројности фибробласта у дерму коже. Међутим, пошто виментин не маркира само фибробласте, већ и ендотелне ћелије, глатке мишићне ћелије, лимфоците и ћелије крви, нисмо могли имати до краја реалну процену, већ само индиректан увид, и то након умањивања дела имунопозитивних ћелија, за утврђени део учешћа понајпре макрофага, али и осталих побројаних ћелија које се маркирају овим бојењем, а које смо елиминисали или по позицији (нпр. ендотелне ћелије и глатке мишићне ћелије) или некој другој карактеристици.

Виментин је протеин молекулске тежине 57 kD, члан фамилије интермедијерних филамената. Заступљен је у мезенхимским ћелијама, нарочито у цитоскелету фибробласта и често се користи као специфични имунохистохемијски маркер управо ових ћелија. Заправо његова експресија представља маркер активације фибробласта и синтезе колагена. Присуство виментин+ ћелија сведочи о постојању ћелија у кожи које су способне да продукују компоненте међућелијског матрикса (Nica и Raica, 2008).

Анализом имунопозитивности на виментин, запазили смо да се она најпре повећава, до 20 година, а потом смањује са старењем и на кожи врата и на кожи стомака. Ово повећање кореспондира са интензивним процесима синтезе који се бележе до тог доба, а затим дегенерацијом екстрацелуларног матрикса (Taketa и сар. 1994; На и сар. 2005; Dumas и сар. 2005). Смањење експресије је значајније изражено на кожи врата, где смо запазили, да је уз нарушену хистоархитектонику дерма, евидентно и смањење броја и густине фибробласта. Ово смањење је у корелацији са смањеним степеном имунохистохемијске позитивности ћелија, као и релативног интензитета бојења ћелија на виментин. Резултате сличне нашим презентовала је и Savić (2011), која је смањење експресије виментина регистровала у кожи мишева, након UVA експозиције. Познато је да UVA зрачење доводи до смањења бројности и густине фибробласта, покретањем процеса апоптозе која је индукована оксидацијским стресом. Фибробласти показују већи степен осетљивости на оксидативна оштећења у односу на кератиноците (Marionnet и сар. 2010) које може бити забележено већ након ирадијације од 25 J/cm² UVA зрака (Bernerd и Asselineau 1998).

Nica и Raica (2008) су у својој студији, која је испитивала ефекат утицаје фракционог CO₂ ласера на кожу, приметили да се ниво експресије виментина у дерму, који се сматра „идеалним стимулатором“ продукције активатора пролиферације фибробласта (PDGF-а), повећао после деловања одређене дозе зрачења. Аутори саопштавају да присуство имунохистохемијски позитивних ћелија на виментин, значи да у кожи постоје ћелије које су неповређене и неоштећене и које су способне да продукују компоненте међућелијског матрикса. Такође су навели да експресија виментин+ ћелија у кожи зависи од дозе зрачења, иако не могу да прокоментаришу овај став (Nica и Raica, 2008). Интересантно је, да се појачана продукција виментина раније повезивала са сенесцентним фибробластима, а данас се претпоставља да би та реакција могла бити целуларни одговор, у циљу компензовања оштећеног виментина (Kuerer и сар. 2007).

Сличан став саопштавају Du Toit и сар. (2007) наводећи да се након третмана и фацијалне рејувенације коже евидентира обнављање смањеног броја дермних фибробласта и активација мирујућих и остарелих фибробласта.

Дермни фибробласти су и важне компоненте имунског система коже, које уз кератиноците могу да допринесу одржавању хомеостазе овог система. Фибробласти продукују секундарне цитокине, као одговор на стимулацију примарним цитокинима, пореклом од кератиноцита (Voxman и сар. 1993). Сматра се да су фибробласти главни извор TNF-α који се у кожи јавља након UVB- зрачења. Продукција секундарних цитокина од стране фибробласта представља важан, досад занемариван, амплификацијски механизам у одговору на цитокине које продукују кератиноцити (Zorina, 2011).

Kuerer и сар. (2007) саопштавају да се идентификацијом виментина у хуманим фибробластима може одредити и степен гликације, а самим тим и старења ћелија. Наиме, познато је да су најчешћа оштећења протеинских молекула гликозилација и оксидативна оштећења. Гликозилација је реакција у којој се редукујући шећери (глукоза или фруктоза) везују за аминок групе протеина и других макромолекула (нуклеинских киселина) механизмом нуклеофилне адиције. Продукти унапредовалог процеса гликозилације повећавају стопу ткивне продукције слободних радикала и до 50 пута и тиме оштећују структуру протеинских молекула процесом оксидације (Vrnđić и сар. 2010). Идентификација виментина као главног протеина оштећења у агресомима (региони у ћелији где се налазе агрегати протеина) подржава теорију да

агрегација протеина, непосредно наглашава старење ткива и повезује старење са гликацијом (неензимска гликолизација) (Куерг и сар. 2007; 2008).

Недавно су Jung и сар. (2014) спровели истраживање које се бавило променом експресије виментина у хуманим ендотелним ћелијама дермалне микроваскулатуре, након UV зрачења и примене ласер светлости IPL-a (engl. intense pulsed light). Аутори су закључили да виментин и продукти гликозилације могу бити корисни маркери старења ћелија, као и процене тежине старења. Такође, повећање експресије виментина и крајњих продуката гликација могли би представљати мету за лечење старења коже.

Без обзира на сва ограничења везана за методологију и маркирање фибробласта, мишљења смо да прогресивно смањење експресије виментина у корелацији са старењем и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи може сведочити о прогресивном смањењу броја и функционалног капацитета дермних фибробласта. Већа експресија на фотонеекспонираној кожи сведочи о штетном деловању хроничне инсолације.

Један од специфичних циљева нашег истраживања био је и одређивање изражености тумор супресорског гена p53 у кожи у корелацији са старењем. Ген p53 је најчешће мутирани ген код малигних тумора уопште и најчешће мутирани ген код базалиома (Tilli и сар. 2005). У различитим истраживањима саопштено је да постоји велика имунохистохемијска израженост p53 код базалиома (Chang и сар. 1998; Vidal и сар. 2004; Zagrodnik и сар. 2003; Moles и сар. 1993; Boonchai и сар. 2000; De Rosa и сар. 1993; Ansarin и сар. 2006; Ауеремкиате и сар. 2002; Bolshakov и сар. 2003), па се имунохистохемијска анализа изражености p53 онкопротеина сматра корисним показатељем мутација p53.

Ген p53 је веома је важан за механизме репарације DNK јер спречава неопластичну трансформацију ћелија. У случајевима када је оштећење DNK таквих размера да га није могуће поправити, p53 протеин активацијом p21 и bax гена започиње и регулише процес апоптозе којим се елиминишу оштећене ћелије, те на тај начин онемогућава настанак тумора. И у случајевима леталног оштећења DNK изазваног UV зрацима p53 индукује покретање процеса програмирање ћелијске смрти (Mullauer и сар. 2001; Matsumura и Ananthaswamy, 2004; Kumar и сар. 2010).

Смрт ћелија апоптозом битна је за одржавање нормалне пролиферације ћелија коже, за одржавање нормалне дебљине коже и формирање корнеалног слоја. Апоптоза представља и битан одбрамбени механизам од настанка тумора коже у

случајевима када ћелије коже накупе одређене мутације и буду оштећене (Assefa и сар. 2005). Бројне студије доказале су да је UV зрачењем узрокована специфична мутација p53 тумор супресорског гена, а тиме и блокирање процеса апоптозе, рани и један од најважнијих догађаја у настанку базалиома и карцинома плочастих ћелија коже. Мутирани p53 није функционалан, те губи своју улогу у регулацији ћелијског раста и уклањању оштећених ћелија путем апоптозе (Backvall и сар. 2004а; 2004б). Можемо закључити да је разумевање процеса апоптоза изазваног UV зрачењем кључ разумевања патогенезе настанка и развоја кожных тумора.

Многобројни истраживачи саопштавају да епидермис фотооштећене коже карактерише изражена експресија протеина p53 (Ponten и сар. 1995; Qin и сар. 2002). У исто време позитивна имунореактивност на фотонеекспонираној кожи је или негативна или слабо позитивна (Blatt и сар. 1999). По мишљењу Тао и Levine (1999) у нормалним ћелијама протеина p53 има мало. Полупериод живота овог протеина је приближно 5—20 мин, а p53 се непрестано обнавља путем синтезе. Такође је саопштено да у физиолошким условима «дивљи» тип (wt) p53, карактерише кратак период полураспада (не дуже од 20 мин) и да се налази у ћелијама у веома малим концентрацијама које су ниже од осетљивости имунохистохемијских метода (Vitruk и сар. 2008).

Хронолошко и фотостарење коже прати повећање броја ћелија епидермиса које исказују експресију p53, а такође и повећање акумулације протеина у једрима ћелија фотоекспониране коже. Постоје саопштења о повећању конституционалне експресије протеина p53 у епидермису човека са повећањем имунопозитивних ћелија током старења (Смирнова и сар. 2005).

Витрук (2008), Витрук и сар. (2008) су истраживали садржај маркера апоптозе у биопсијама коже лица, груди и врата 16 жена, старости од 16 до 64 године и показали да се количина p53 позитивних ћелија повећава са старењем. Vitruk и сар. (2008) су у свом истраживању утврдили да се ниво p53-имунопозитивних кератиноцита у узорцима коже младих са 3,8 -17,9% повећава на 63 - 90% у кожи особа средњег и старијег животног доба. Vitruk и сар. (2008) истичу да се са хронолошким старењем повезане промене у систему регулације апоптозе, тичу повећања нивоа експресије протеина p53 и bax у ћелијама епидермиса. С обзиром да је апоптоза резултат деловања многих фактора (оксидациони стрес, UV зрачење, јонизујуће зрачење, хипоксија, хемикалије, вирусне инфекције, итд), постаје јасно да

са старењем долази до акумулације фактора који изазивају повећане проапоптотичне сигнале.

Ми смо у нашем истраживању установили, да иако се епидермис узрасно мења, најпре се удебљава, а потом истањује, количина p53 позитивних ћелија се са узрастом углавном повећава. Израчунавањем броја p53 позитивних ћелија по слојевима установили смо да је садржај ових ћелија у базалном слоју релативно мали. Највећу количину p53 позитивних ћелија садржи спинозни слој. Повећање ових ћелија у старијем добу и на фотоекспонираној кожи, резултат је повећања њиховог броја у базалном и супрабазалном слоју. У раном животном добу епидермис значајно задебљава, што је повезано са његовом већом пролиферативном активношћу и првим значајнијим повећањем садржаја p53 позитивних ћелија. Ово је потпуно јасно зато што маркер p53 маркира ћелије са повређеном DNK или ћелије које су у процесу апоптозе (Nigro и сар. 1997; Chylicki и сар. 2000; Raj и Brash, 2006), што значи да виша пролиферативна активност, има већу вероватноћу појављивања ћелија са оштећеном DNK.

Са старењем долази до истањења епидермиса и снижења нивоа пролиферативне активности кератиноцита са истовременим прогресивним повећањем броја p53 позитивних ћелија, посебно на фотоекспонираној кожи. Појављивање веће експресије p53 у кожи која има ниску пролиферативну активност (старије животно доба) повезано је вероватно са другим узроцима, поготову што је извесно, да се број ћелија са оштећеном DNK са старењем повећава у многим ткивима (Batinas и сар. 2004; Чумаков, 2007). Висок проценат јаке изражености p53 у нашем истраживању може се објаснити релативно ниско постављеном границом за јако изражену реакцију (више од 50% позитивних ћелија). Осим тога, могућа је позитивна имунореактивност и у одсуству мутације (тзв. лажно позитивни резултати) (Campbell и сар. 1993; Stratigos и сар. 2005) као и у клинички непромењеном епидермису (Urano и сар. 1995, Demirkan и сар. 2000).

У студији El-Domyati и сар. (2003) истраживачи су пронашли висок ниво експресије овог протеина у епидермису током активне сезонске инсолације. El-Domyati и сар. (2003) су изучавали кожу лица која је под сталним утицајем Сунчевог зрачења и кожу стомака, заштићену од сунца, код људи, оба пола и узраста од 6 до 77 година. Показано је да иста доза инсолације код старијих особа више оштећује DNK кератиноцита него код младих, што се првенствено одражава у епидермису на појава p53 позитивних ћелија. Дакле ова студија је показала да код фотостарења долази до

акумулације протеина у једрима кератиноцита, а такође и до повећања броја ћелија које експримују овај маркер. Ови резултати су у складу са нашим истраживањем, јер смо и ми утврдили да се степен експресије p53 повећава са старењем и то више на фотоекспонираној, него на фотонеекспонираној кожи.

Повећану експресију p53 на фотоекспонираној кожи је могуће објаснити као компензаторни механизам који се развија након хроничног мутагеног дејства UV зрачења, а стимулисан је пролиферативном активношћу ћелија. Такође, Wassberg и сар. (2003) истичу да је појава ове реактивности одговор на повреде коже, деловањем различитих фактора, па и UV зрачења.

Студија Rajabi и сар. (2006), базирана на имунохистохемијским анализама, показала је прекомерну експресију овог протеина и у нетуморском епидермису особа са БЦК-ом, што је значајно асоцирано са изложеношћу коже Сунчевом зрачењу. Такође, у њиховој студији је показано да је експресија p53 протеина корелише са узрастом пацијената, тако да би рана акумулација овог протеина могла бити један од показатеља за детекцију немеланомског карцинома коже. Трећи закључак њихове студије је да имунохистохемијске технике не могу да детектују геномску нестабилност или абнормалности настале у ћелијском циклусу, па стога препоручују молекуларне технике за прецизну и рану детекцију мутација у TP53.

Такође је показано, да се првог дана након озрачивања UV зрацима региструје повишена експресија p53, која траје до 15 дана од озрачивања (Ponten и сар. 1995). У нашем истраживању, на кожи врата смо регистровали велики број ћелија које експримују p53, што је пре последица континуираног деловања UV зрачења, а не акутног како наводи ова студија. У прилог овој тези је и закључак, да пошто се експресија p53 повећава са старењем вероватно да је имунопозитивност одговор на акумулацију током година, а не реактивни одговор на недавна излагања Сунцу.

Старосно-зависна p53 акумулација на фотоекспонираној кожи може се делимично објаснити преко диференцијације оштећених кератиноцита. Наиме, уочено је да је степен нуклеарног изражавања p53 обрнуто пропорционалан степену диференцијације кератиноцита и виђа се и код нормалног епидерма, диспластичних ћелија и канцерозних кератиноцита (Fung и Fisher, 1995). Фотооштећени кератиноцити су изгледа макар делимично изгубили способност диференцијације (Yaar и Gilchrist, 1998), па је могуће да акумулација дивљег типа p53 у фотооштећеној кожи има везе са измењеном диференцијацијом кератиноцита. Поред диференцијације и трансдукција је промењена у сенесцентим ћелијама (Yaar и

Gilcrest, 1998). У исто време, способност ћелија за репарацију оштећених DNK се смањује са годинама (Moriwaki и сар. 1996). Може се претпоставити да код младих особа p53 првенствено активира репарацију повређене DNK, иако апоптоза такође овде има своје место. Код старих се повећава број ћелија са повређеном DNK и они улазе у процес апоптозе мада се и репарација DNK у овом узрасту не може апсолутно искључити. Закључак је да су терминална диференцијација и апоптоза различити путеви ћелијске смрти. О овом говори чињеница да се p53 позитивне ћелије не срећу у зрнастом и корнеалном слоју, тамо где је процес терминалне диференцијације, а не апоптозе (Горелова, 2010).

Људска кожа као и други органи у телу подлеже процесу старења. Међутим они делови коже који су изложени деловању UV зрачења имају значајно погоршање већ постојећих ефеката интринзичког старења (Thurstan и сар. 2012). Због тога се на деловима коже који су стално изложени деловању ултравиолетног зрачења налазе манифестације и ендогеног и егзогеног старења (Fisher и сар. 2002), односно у основи лежи ендогено старење алтерисано утицајем штетних егзогених фактора понајпре UV зрачења. Због тога се кожа предлаже као идеалан модел за проучавање обе варијанте старења (Thurstan и сар. 2012).

Ми смо у нашој студији утврдили да на фотонеекспонираној кожи након узрасног повећања долази до атрофије вијабилног епидерма, смањења дебљине корнеалног слоја, заравњења ЕД границе, атрофије дерма, укупног стањивања дебљине коже, реорганизовања ЕЦМ-а, кроз смањење количине колагених влакана, смањење количине еластичних влакана и повећање простора који припада основној супстанци. Хроностарење у основи има и редукцију васкуларне мреже, смањење броја и функционалног капацитета фибробласта, са постепеном редукцијом ћелија које припадају имунском систему тј. ЛТ_h, дендритичних ћелија, макрофага и мастоцита. Такође је повезано и са смањењем количине меланина и броја меланоцита у кожи као и повећањем експресије маркера апоптозе P53.

Иста динамика промена ћелијско-матриксних односа у епидерму и дерму прати старење на фотонеекспонираној кожи, али са значајно израженијим манифестацијама свих обележја, сем количине еластичних влакана која имају супротну динамику. Међутим, акумулација еластичног материјала је посебан патофизиолошки ентитет који се манифестује искључиво на фотонеекспонираној кожи и представља маркер оштећења услед деловања UV зрачења. Налаз повећаног броја инфламаторних ћелија као што су мастоцити, макрофаги и дендритичне ћелије на

кожи која је фотоекспонирана сведочи и о могућој инфламаторној патогенези фотостарења. На основу свега наведеног могли би да закључимо да у основи старења фотоекспониране коже лежи интринзичко старење на које су суперпониране промене екстринзичког старења.

Морамо се осврнути и на морфолошка мерења која су у овом истраживању примењена, а то је квантификација уз помоћ софтверске анализе дигиталних слика у програму *ImageJ* која омогућава ефикасну обраду ткивних резова и захтева много мање времена него конвенционалне методе, а добијени резултати блиско корелирају са резултатима класичних мануелних метода. Иако резултати зависе од квалитета слике и параметара које смо у дискусији већ навели, а који могу узроковати одређени ниво грешке, аутоматске технике налазе све већу примену како у научно-истраживачком тако и свакодневном рутинском раду хистолога и патолога (Castleman, 1998; Sanders и сар. 1999).

7. ЗАКЉУЧАК

- ❖ Дебљина епидермиса је у директној корелацији са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи: након рођења задебљава до треће декаде, а потом се прогресивно истањује са старењем.
- ❖ Фотостарење узрокује већу атрофију епидермиса у односу на хроностарење.
- ❖ Дебљина корнеалног слоја је у директној корелацији са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи: након рођења се повећава до пете декаде, а потом се прогресивно истањује са старењем.
- ❖ Фотостарење узрокује задебљање корнеалног слоја, услед развоја хиперкератозе.
- ❖ Дужина епидермно-дермног споја је у директној корелацији са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи: након рођења дужина се повећава до треће декаде, а потом се прогресивно смањује са старењем.

- ❖ Смањење дужине базалне мембране има бржи ток на фотоекспонираној кожи.
- ❖ Дебљина дерма је у директној корелацији са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи: након рођења дебљина се повећава, највишу вредност има у трећој декади, а потом се прогресивно истањује са старењем.
- ❖ Фотостарење узрокује задебљање дерма.
- ❖ Укупна дебљина коже је у директној корелацији са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Фотоекспонирана кожа задебљава са старењем све до треће декаде, остаје на том нивоу до седме декаде, када почиње да се тањи. Фотонеекспонирана кожа задебљава до треће декаде, а онда почиње да се тањи.
- ❖ Кожа је дебља на фотоекспонираним, у односу на фотонеекспониране регије у свим старосним добима.
- ❖ Волуменска густина колагених влакана прогресивно опада са старењем и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи.
- ❖ Губитак колагених влакана са старењем, израженији је на фотоекспонираним у односу на фотонеекспониране регије, а квантитативна евалуација волуменске густине колагених влакана дерма може рефлектовати клиничку тежину фотостарења.
- ❖ Динамика промена васкуларне мреже са старењем иста је и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи, с тим што је прогресивно смањење васкуларне мреже, које креће од четврте декаде, израженији на фотоекспонираној кожи.
- ❖ Прогресивно смањење дермне васкулатуре изражено је, са морфолошке тачке гледишта, кроз смањење величине крвних судова и прогресивно нумеричко смањење.

- ❖ Експресија VEGF-а је повећана на фотоекспонираној кожи позног и најстаријег животног доба.
- ❖ Величина ЕЦМ-а повећава се у корелацији са узрастом и старењем и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи, с тим што фотоекспонирана кожа садржи већу количину основне супстанце у свим узрастним и старосним групама.
- ❖ Заступљеност еластичних влакана у корелацији са узрастом нема исти ток на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Фотоекспонирана кожа садржи већу количину еластичних влакана у односу на фотонеекспонирану од треће декаде.
- ❖ На фотоекспонираној кожи количина еластичних влакана се прогресивно повећава, па од најмање вредности у кожи беба, достиже највећу вредност у кожи старијих од 60 година.
- ❖ На фотонеекспонираној кожи количина еластичних влакана се прогресивно повећава до треће декаде, а потом прогресивно опада са старењем.
- ❖ Најважнија карактеристика фотостарења је соларна еластоza која почиње на споју папиларног и ретикуларног дерма и која се хистолошки карактерише формирањем уплетених еластичних влакана који са прогредирањем прелазе у аморфну масу. Знаци соларне еластоze се искључиво налазе у фотоекспонираној кожи.
- ❖ Акумулација еластичног материјала праћена је дегенерацијом околне колагене мреже, а прогресивно нагомилавање еластичних влакана представља примарно обележје фотостарења.
- ❖ Број мастоцита корелише са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи и већи је на фотоекспонираној у односу на фотонеекспонирану кожу.

- ❖ Број Лангерхансових ћелија корелише са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Повећава се све до треће декаде, а потом почиње да опада, с тим што је број Лангерхансових ћелија значајно је мањи на фотоекспонираној кожи у односу на фотонеекспонирану.
- ❖ Број дендритичних ћелија повећава се са узрастом, више на фотоекспонираној у односу на фотонеекспонирану кожу.
- ❖ Број макрофага корелише са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи, а значајно је већи на фотоекспонираној кожи у односу на фотонеекспонирану.
- ❖ Број меланоцита корелише са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Расте до треће декаде, а потом опада. Фотоекспонирана кожа садржи више меланоцита него фотонеекспонирана, сем у групи најстаријих.
- ❖ Количина меланина у епидермису позитивно корелира са узрастом и на фотоекспонираној и на фотонеекспонираној кожи. Меланин има тенденцију пораста до позног животног доба, а након тога тенденцију опадања код старијих од 60 година, с тим што фотоекспонирана кожа садржи више меланина у односу на фотонеекспонирану.
- ❖ Смањење експресија виментина позитивно корелише са старењем, а експресија виментина је мања на фотоекспонираној у односу на фотонеекспонирану кожу од треће декаде.
- ❖ Густина фибробласта опада пропорционално степену колагенолизе и годинама старости и већа је на фотоекспонираној него на фотонеекспонираној кожи, те може послужити као индикатор степена деструкције дерма у фотостарењу.
- ❖ Механизми нарушавања ћелијско-матриксних интеракција у кожи при хронолошком и фотостарењу повезани су са сниженим пролиферативним потенцијалом дермних фибробласта.

- ❖ Повећање експресије p53 позитивно корелише са старењем, а зрела фотоекспонирана кожа има значајно већи ниво експресије p53.
- ❖ За узрасно остарелу кожу, маркер апоптозе ћелија епидермиса, p53 појачано је експримован у базалним и супрабазалним кератиноцитима и региструје се повећањем броја имунопозитивних ћелија.
- ❖ Унутрашње старење се првенствено манифестује физиолошким променама, а најупечатљивија промене интринзичког старења су: смањење дебљине епитела, смањење дебљине дерма, смањење дермне прокрвљености и заравњење епидермно-дермне границе са губитком дермних папила и хипоцелуларност.
- ❖ Карактеристике хронолошки остареле коже су и редукција колагена, смањење количине еластичних влакана и повећање основне супстанце.
- ❖ Најупечатљивија промене екстринзичког старења су задебљање корнеалног слоја, повећање дебљине дерма, укупно задебљање коже, дегенерација колагених влакана (базофилна дегенерација) и повећање количине еластичних влакана (соларна еластоза).
- ❖ Налаз повећаног броја инфламаторних ћелија као што су мастоцити, макрофаги и дендритичне ћелије на кожи која је фотоекспонирана сведочи о могућој инфламаторној патогенези фотостарења.
- ❖ Хронолошка динамика инволутивних промена фотонеекспониране коже: почетне промене од 41. до 60. године, умерене преко 60 година, а хронолошка динамика инволутивних промена фотоекспониране коже: почетне промене од 21. до 40. године, умерене 41-60. године и прогресивне, преко 60 година.
- ❖ Први знак хронолошког старења у кожи је дегенерација колагених влакана и фокално накупљање основне супстанце у дерму, а код фотостарења- дегенерација колагених влакана, фокално накупљање основне супстанце и еластоза у дерму.

- ❖ Хронично и фотостарење карактерише промена ћелијско-матриксних односа у епидерму и дерму, значајније изражена у кожи која је хронично изложена зрачењу. Хроностарење карактеришу дистрофичне, а фотостарење хипертрофичне промене у дерму.

- ❖ Хистолошка, хистохемијска, имунохистохемијска и стереолошка анализа фотоекспониране и фотонеекспониране коже, различитих животних доби је показала да је старење коже резултат интерактивног деловања интринзичког и екстринзичког старења.

8. ЛИТЕРАТУРА

- Abd El-Aal NH, Abd El-Wadood FA, Moftah NH, El-Hakeem MS, El-Shaal AY, Hassan NB (2012). Morphometry and epidermal fas expression of unexposed aged versus young skin. *Indian J Dermatol* 57(3):181-186.
- Abramović Mirjana, Pavlović Radmila i Rančić Gorana (2006). Bojenje elastičnih tkiva bez diferencijacije: nova, brza metoda. *Acta Medica Medianae*, Vol.45:40-41.
- Abbas AK, Lichtman AH (2003). Cellular and molecular immunology. Saunders, Philadelphia.
- Abraham SN, Malaviya R (2000). Mast cell modulation of the innate immune response to enterobacterial infection. *Adv Exp Med Biol* 479:91-105.
- Ackerman AB, Chongchitnant N, Sanchez J, Guo Y, Bennin B, Reichel M, Randall MB (1997). Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Disease. 2nd ed., edited by G. Stamathis, Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Affinito P, Palomba S, Sorrentino C et al. (1999). Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. *Maturitas* 33(3):239-247.
- Afaq F (2011). Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Arch Biochem Biophys*. Apr 15;508(2):144-51.
- Afaq F, Adhami VM, H. Mukhtar H (2005). Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat. Res* 571(1-2):153-173.
- Agache P, Humbert P (2004). Measuring the skin. Springer Verlag, Berlin.
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM (2004). The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4954-4959.
- Agar N, Young AR (2005). Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutation Res* 571 (1-2): 121-132.
- Agrawal A, Gupta S (2011). Impact of aging on dendritic cell functions in humans. *Ageing Res Rev*.10(3):336-45.
- Алексеев АГ, Банин ВВ, Ноздрин ВИ (2009). Меланоциты кожи. *Морфология* 136, № 5. - С. 81-89.
- Алексеев АГ (2011). Распределение меланоцитов в межфолликулярном эпидермисе и волосяных фолликулах кожи височной области головы у лиц мужского пола в онтогенезе. Научная библиотека диссертаций и авторефератов dissertacija, Moskva.
- Allam JP, Geiger E, Kraft S, Bieber T (2003). Limited reliability of E-cadherin as a specific marker for in vitro-generated Langerhans cells. *Arch Dermatol Res*. 295(6), 263-268.
- Al-Habib F May, Kadhim S Salih (2012). Age-related Changes in Human Skin: Histological, Morphometric and Immunocytochemical Study Using S100. *IRAQI J Med SCI* Vo.10(2).
- Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT (2005). Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem*. 280 (13):12087-12095.
- Amano S (2008). Anti-Ageing Skin Care For Cutaneous Photo-Ageing. *SÖFW-journal* 134:9.
- Amano S (2009). Possible Involvement of Basement Membrane Damage in Skin Photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 14:2-7.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl acad sci Usa* 90(17): 7915-22.
- Ananthaswamy HN, Fourtanier A, Evans RL, Tison S, Medaisko C, Ullrich SE, Kripke ML. (1998). p53 mutations in hairless skh-hr1 mouse skin tumors induced by a solar simulator. *Photochem Photobiol* 67, 227-232.
- Anđelković Z, Somer Lj, Avramović V, Milosavljević Z, Tanasković i sar. (2009). Histologija, Impressum, Niš.
- Anisimov VN (2008). Molecular and physiological mechanisms of aging. «NAUKA» St. Petersburg.
- Anderson D (1996). Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* 350(1):103-108.
- Ansarin H, Daliri M, Soltani-Arabshahi R (2006). Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol* 16(5):543-7.
- Arck P, Paus R (2006). From the brain-skin connection: the neuroendocrine-immune misalliance of stress and itch. *Neuroimmunomodulation* 13(5-6): 347-56.
- Arck PC, Overall R, Spatz K, Liezman C, Handjiski B, Klapp BF, Birch-Machin MA, Peters EM (2006). Towards a "free radical theory of graying": melanocyte apoptosis in the aging human hair follicle is an indicator of oxidative stress induced tissue damage. *FASEB J* 20(9): 1567-69.
- Arenson C, Busby-Whitehead J, Brummel-Smith K, O'Brien JG, Palmer MH, Reichel W. (2009). Reichel's Care of the Elderly: Clinical Aspects of Aging 6th ed. New York, Cambridge University Press.
- Arking R (1991). Biology of ageing: Observation and principles. Englewood Cliffs, N.J. Prentice Hall, Inc.

- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, and Chazaud B (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204 (5), 1057-1069.
- Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Pöppelmann B, Luger TA, Schwarz T (1998). Ultraviolet Light Induces Apoptosis via Direct Activation of CD95 (Fas/APO-1) Independently of Its Ligand CD95L. *J Cell Biol* 140(1): 171-182.
- Assefa Z, Van Laethem A, Garmyn M *et al.* (2005). Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta* 1755:90-106.
- Astner S, Anderson RR (2004). Skin Phototypes 2003. *Journal of Investigative Dermatology* 122(2): xxxxxxi.
- Ashcroft GS, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW (1997). Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and mRNA. *J Pathol* 183:169-176.
- Aubin F (2003). Mechanism involved in ultraviolet light induces immunosuppression. *Eur J Dermatol* 13 (6):515-23.
- Auepemkiate S, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P (2002). p53 expression related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma. *Histopathology* 40 (6):568-73.
- Averbek M, Gebhardt CA, Voigt S, Beilharz S, Anderegg U, Termeer CC, Sleeman JP, Simon JC (2007). Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 127: 687-697.
- Байрейтер К, Франц П, Родеман Х (1995). Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации. *Онтогенез* 236(1):22-37.
- Babior BM (2000). Phagocytes and Oxidative Stress. *Am J Med* 109(1):33-44.
- Bahar AM, Barbara B, Tredget EE, Ghahary A (2004). Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and type I and III procollagen mRNA. *Wound rep* 12(2):175-182.
- Backvall H, Stromberg S, Gustafsson A, *et al.* (2004a). Mutation spectra of epidermal p53 clones adjacent to basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol* 13(10):643-650.
- Backvall H, Wolf O, Hermelin H, *et al.* (2004b). The density of epidermal p53 clones is higher adjacent to squamous cell carcinoma in comparison with basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*;150(2):259-266.
- Bacharach-Buhles M: Lubowitzki M, Altmeyer P (1999). Dose-Dependent Shift of Apoptotic and Unaltered Melanocytes into the Dermis after Irradiation with UVA 1. *Dermatology* 198(1) 5-10.
- Bailey JW, Walker E, Beauchene RE (1993). Fatty acid composition of adipose tissue in aged rats: effects of dietary restriction and exercise. *Exp Gerontol* 28(3): 233-47.
- Bailey AJ (2001). Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev*.122(7):735-55.
- Bainbridge J, Sivakumar B, Paleolog E (2006). Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis: lessons from oncology. *Curr Pharm Des* 12:2631-2644.
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, *et al.* (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244(4901):217-21.
- Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, *et al.* (2005). Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* 115:247-257.
- Banett YA (1997). Somatic mutations and aging: cause or effect? *Biochem Soc Transactions* 25: 332-5.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, LeBecque S *et al.* (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
- Bancroft JD and Cook HC (1984). Manual of histological techniques. Manual of histological techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York.
- Barrett AW, Cruchley AT, Williams DM (1996). Oral mucosal Langerhans' cells. *Crit Rev Oral Biol Med* 7(1):36-58.
- Barret TL, Smith KJ, Hodge JJ *et al.* (1997). Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, and Ki67 in different histologic variants of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 37(3 Pt1):430-7.
- Barja G (2007). Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated. *Rejuvenation Res* 10(2): 215-24.
- Barja G (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci*. 27(10):595-600.
- Barnadas MA, Colomo L, Curell R, De Moragas (1996). Expression of the p53 protein in sun-damaged skin. *Acta Derm Venereol* (Stockh) 76:203-204.
- Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 279(48): 49883-49888.
- Barbosa A.J, Castro L.P, Margarida A. and Nogueira MF (1984). A Simple and Economical Modification of the Masson-Fontana Method for Staining Melanin Granules and Enterochromaffin Cells. *Stain Technology* 59(4): 193-6.
- Basile JR, Eichten A, *et al.* (2003). NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol Cancer Res* 1(4): 262-70.
- Baker GT, Sprott RL (1988). Biomarkers of aging. *Exp Gerontol* 23(4-5): 223-239.
- Barker Donald (1951). Skin thickness in human. *Plastic&Reconstructive Surgery*. 7 (2): 115-116.
- Battifora H (1991). Assessment of antigen damage in immunohisto-chemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol* 96(5): 669-71.
- Batinac Tanja, Zamolo Gordana *et al.* (2004). p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. *Tumori*, 90(1): 120-27.
- Bauer EA, Cooper TW, Huang JS, Altman J, Deuel TF (1985). Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4132-6.
- Baumann Leslie (2009). Cosmetic Dermatology: Principles and Practice, Second ed. The McGraw-Hill Professional.

- Beattie PE, Finlan LE, Kernohan NM, Thomson G, Hupp TR, Ibbotson SH (2005). The effect of ultraviolet (UV) A1, UVB and solar-simulated radiation on p. 53 activation and p21. *Br. J. Dermatol.* 152(5): 1001-8.
- Bency X, Lizamma A (2011). A microscopic study of human skin from various anatomical sites of a cadaver. *Pushpagiri Medical Journal* 2(2). January – June.
- Bennett CL, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinman RM, Kapsenberg ML, and Clausen BE (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169(4) : 569-76.
- Bennett CL, Noordegraaf M, Martina CA, Clausen BE (2007). Langerhans' cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to cells. *J Immunol* 179(10): 6830–5.
- Bennett Mary F, Robinson Michael K., Baron Elma D and Cooper Kevin D (2008). Skin Immune Systems and Inflammation: Protector of the Skin or Promoter of Aging? *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 13, 15–19.
- Bennet DC, Medrano EE (2002). Molecular regulation of melanocyte senescence. *Pigment Cell Res* 15:242–50.
- Bentley JP (1979). Aging of collagen. *J Invest Dermatol* 73(1): 80-3.
- Benjamin CL, Ananthaswamy HN (2007). p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 224(3):241-8.
- Benjamin CL, Ullrich SE, Kripke ML et al. (2008). p53 tumor suppressor gene: a critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer. *Photochem Photobiol* 84(1):55-62.
- Berneis K, Keller U (1996). Metabolic actions of growth hormone: direct and indirect. *Baillieres Clin endocrinol Metab* 10(1): 337–52.
- Berg RJ, et al. (1996). Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UVB radiation: Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 274-278.
- Bergendi L, Beneš L, Duračková Z i sar. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65(18-19):1865-74.
- Berneburg M, Gattermann N, Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, Krutmann J (1997). Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem Photobiol* 66(2): 271–275.
- Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J (2000). Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16(6): 239-44.
- Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, Uitto J (1994). Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol* 103(2):182–6.
- Bernstein EF, Brown DB, Chen YQ, , Fisher L, Hahn PJ, Kopp JB, Lakkakorpi J, Robey FA, Uitto J (1996). Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. *J Am Acad Dermatol* 34(2 Pt 1):209-18.
- Bernstein EF, Uitto J (1996). The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clinics in dermatology.* 14(2): 143-51.
- Bernstein EF et al. (1997). Evaluation of sunscreens with various sun protection factors in a new transgenic mouse model of cutaneous photoaging that measures elastin promoter activation. *J Am Acad Dermatol* 37: 725- 729.
- Bernerd F, Asselineau D (1998). UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. *Cell Death Differ.* 5:792–802.
- Bernerd F (2005). Human skin reconstructed in vitro as a model to study the keratinocyte, the fibroblast and their interactions: photodamage and repair processes. *J Soc Biol* 199 (4): 313-20.
- Besne I, Descombes C, Breton L (2002). Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol* 138(11): 1445-50.
- Bhawan J, Oh CH, Lew R et al. (1992). Histopathologic differences in the photoaging process in facial versus arm skin. *Am J Dermatopathol* 14:224–30.
- Bielenberg DR, Bucana CD, Sanchez R, Donawho CK, Kripke ML & Fidler IJ (1998). Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis. *J Invest Dermatol* 111: 864–872.
- Birch-Machin MA, Tindall M, Turner R, Haldane F, Rees JL (1998). Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. *J Invest Dermatol* 110(2): 149–152.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B et al. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197–250.
- Bissett DL, Hannon DP, Orr TV (1987). An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol* 46: 367–378.
- Blanpain C, Fuchs E (2006). Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:339-73.
- Blasco MA, et al. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91(1): 25-34.
- Blatt T, Mundt C, Mummert C et al. (1999). Modulation des oxidatives stresses in der humanen altershaut. *Z. Gerontol. Geriatr.* Bd. 32(2). S. 83—88.
- Bhushan M, Young HS, Brenchley PE, Griffiths CE (2002). Recent advances in cutaneous angiogenesis. *Br J Dermatol.* 147(3):418-25. Review.
- Boissy RE (2003). Melanosome Transfer to and Translocation in the Keratinocyte. *Experimental Dermatology* 12(Suppl 2): 5-12.
- Бозо ИЯ, Деев ПВ, Пинаев ГП (2010). Фибробласт – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? *Цитология* 52(2):99–109.
- Bolling MC, Jonkman MF (2009). Skin and heart: une liaison dangereuse. *Exp Dermatol* 18(8): 658-68.

- Bolshakov S, Walker CM, Strom SS i sur. (2003). p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 9:228-34.
- Bologna JL, Orlow SJ (2003). Melanocyte Biology. In: J.L. Bologna, J.L. Jorizzo, et al. (Eds), *Dermatology*, 1st ed., pp. 43-54. Vol. 1. C.V. Mosby.
- Bonta M, Daina L, Muțiu G (2013). The process of ageing reflected by histological changes in the skin. *Rom J Morphol Embryol* 54(3 Suppl):797-804.
- Boonchai W, Walsh M, Cumming M et al. (2000). Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 136(2):195-8.
- Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204 (6): 1303-1310.
- Boorsma J, Watson REB, Craven NM (1996). Collagen IV in photoaged skin. *J Invest Dermatol* 107: 516.
- Bosset S, Bonnet-Duquenois M, Barre P et al. (2003). Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. *Br J Dermatol* 149:826-35.
- Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, Alexander A, Diedrich MJ, Grossman D (2003). Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol* 120(1):48-55.
- Boxman I, Löwik C, Aarden L, Ponc M (1993). Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction. *J Invest Dermatol* 101(3), 316-324.
- Braff MH, Di Nardo A, Gallo RL (2005). Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 124(2):394-400.
- Branchet MC, Boissac S, Frances C, Robert AM (1990). Skin thickness changes in normal aging skin. *Gerontology* Vol. 36(1): 28-35.
- Brauchle M, Funk JO, Kind P & Werner S (1996). Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem* 271: 21793-21797.
- Braverman IM, Keh-Yen A (1981). Ultrastructure of the human dermal microcirculation: III. The vessels in the mid- and lower dermis and subcutaneous fat. *J Invest Dermatol* 77: 297-304.
- Braverman IM, Fonferko E (1982). Studies in cutaneous aging: II. The microvasculature. *J Invest Dermatol* 78(5): 444-448.
- Braverman IM, Key-Yen A (1983). Ultrastructure and three-dimensional reconstruction of several macular and papular telangiectases. *J Invest Dermatol* 81(5): 489-497.
- Braverman IM, Sibley J (1990). Ultrastructural and threedimensional analysis of the contractile cells of the cutaneous microvasculature. *J Invest Dermatol* 95(1): 90-6.
- Braverman IM (1993). Cutaneous microvasculature. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, editors. *Dermatology in general medicine*. New York, McGraw-Hill 390-6.
- Braverman IM (1997). The Cutaneous Microcirculation: Ultrastructure and Microanatomical Organization. *Microcirculation* 4(3): 329-340.
- Braverman IM (2000). The cutaneous microcirculation. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 5:3-9.
- Brenneisen P, Sies H, Scharfetter-Kochanek K (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 973: 31-43.
- Brenner M, Degitz K, Besch R et al. (2005). Differential expression of melanoma-associated growth factors in keratinocytes and fibroblasts by ultraviolet A and ultraviolet B radiation. *Br J Dermatol* 153:733-9.
- Brenner M, Hearing JV (2008). The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem Photobiol* 84 (3) 539-49.
- Brenner M, Hearing VJ (2008). Modifying skin pigmentation - approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discov Today Dis Mech* 5(2): e189-e199.
- Breitkreutz D, Mirancea N, Nischt R (2009). Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol* 132(1):1-10.
- Brincat M, Moniz CF, Kabalan S, Versi E, O'Dowd T, Magos AL, Montgomery J, Studd JW (1987). Decline in skin collagen content and metacarpal index after the menopause *Br J Obstet Gynaecol*. 94(2):126-9.
- Brincat MP (2004). Oestrogens and the skin. *J Cosm Dermatol* 3(1):41-49.
- Brody I (1977). Ultrastructure of the stratum corneum. *International Journal of Dermatology* 16(4), 245-56.
- Brown JA, Smoller BR (2010). Special Stains in Dermatopathology, In Special stains and h & e, 199-204, Copyright 2010 Dako North America, Carpinteria, California.
- Brown LF, Berse B, Jackman RW et al. (1993). Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol*. 143:1255-1262.
- Brown LF, Harist TJ, Yeo KT, Stahle-Backdahl M, Jackman RW, Berse B, Tognazzi K, Dvorak HF, Detmar M (1995a). Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis, and erythema multiforme. *J. Invest. Dermatol*, 104, 744-49.
- Brown LF, Olbricht SM, Berse B, Jackman RW, Matsueda G, Tognazzi KA, Manseau EJ, Dvorak HF, Van de Water L (1995b). Overexpression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) and its endothelial cell receptors in delayed hypersensitivity skin reactions. *J Immunol*. 154(6):2801-7.
- Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, et al. (1992). Expression of VEGF by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 176(5):1375-9.
- Brown RG, Burns T (1996). *Dermatology*. Seventh edition. Oxford: *Blackwell science Ltd*.

- Brunk UT, Terman A (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33(5): 611–19.
- Bulteau AL1, Moreau M, Saunio A et al. (2006). Algae extract-mediated stimulation and protection of proteasome activity within human keratinocytes exposed to UVA and UVB irradiation. *Antioxid Redox Signal* .8(1-2):136-43.
- Burren R, Scaletta C, Frenk E, Panizzon RG, and Applegate LA. (1998). Sunlight and carcinogenesis: expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations. *Int J Cancer* 76, 201-6.
- Butler ST, Fosko SW (2010). Increased prevalence of left-sided skin cancers. *J Am Acad Dermatol* 63(6): 1006-10.
- Butnaru CA, Kanitakis J (2002). "Structure of normal human skin." *Eur J Dermatol* 12(6): II-IV.
- Bumbaširević V (2000). Građa i razvoj kože. In: Karadaglić Đ, ed. *Dermatologija*. Beograd: Vojnoizdavački zavod. 65-86.
- Byers HR, Maheshwary S, Amodeo DM, Dykstra SG (2003). Role of Cytoplasmic Dynein in Perinuclear Aggregation of Phagocytosed Melanosomes and Supranuclear Melanin Cap Formation in Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 121(4): 813-20.
- Cadet J, Sage E, Douki T (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571(1-2): 3-17.
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL, Di Mascio P (2009). Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem Photobiol Sci* 8: 903-11.
- Cadet J, Douki T (2011). Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *J Invest Dermatol* 131(5): 1005-7.
- Caughey GH (2007). Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev* 217:141–54.
- Cai JP, Harris B, Falanga V, Eaglstein WH, Mertz PM, Chin YH (1990). Recruitment of mononuclear cells by endothelial cell binding into wounded skin is a selective, time-dependent process with defined molecular interactions. *J Invest Dermatol* 95(4):415-21.
- Callaghan TM, Wilhelm KP (2008). A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part 2: Clinical perspectives and clinical methods in the evaluation of ageing skin. *Int J Cosmet Sci* 30(5): 323-32.
- Calonje B, Brenn T, Lazar, McKee P (2011). *McKee's Pathology of the Skin*. 4th Edition Saunders, The Structure and Function of Skin.
- Cameron IL (1972). Cell proliferation and renewal in aging mice. *J Gerontol* 27(2): 162-72.
- Campisi J (1996). Replicative senescence: an old lives, tale? *Cell* 84(4): 497-500.
- Campbell C, Quinn AG, Angus B, Rees JL. (1993). The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 129(3):235-41.
- Caprari P, et al. (1999). Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. *Exp Gerontol* 34(1): 47-57.
- Carriel VS, Aneiros-Fernandez J, Arias-Santiago S, Garzón IJ, Alaminos M, Campos A (2011). A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *J Histochem Cytochem* 59(3):270-7.
- Carlidge P (2000). The epidermal barrier. *Semin Neonatol* 5(4): 273-80.
- Castleman KR (1998). Concepts in Imaging and Microscopy: Color Image Processing for Microscopy. *Biol Bull* 194:100-107.
- Chang CH, Tsai RK, Chen GS et al. (1998). Expression of bcl-2, p53 i Ki-67 in arsenical skin cancers. *J Cutan Pathol* 25(9):457-62.
- Chang H, Chi J-T, Dudoit S, et al. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS* 99(20):12877-82.
- Chen M, Peterson MJ, Li HL (1997). Ultraviolet A irradiation upregulates type VII collagen expression in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 108: 125–8.
- Chylicki K et al. (2000). Characterization of the molecular mechanisms for p53 mediated differentiation. *Cell Growth Differ*. Nov 11(11):561-71.
- Choi JH, Yu BP (1995). Brain synaptosomal aging: Free radicals and membrane fluidity – *Free Radic Biol Med* 18(2): 133–9.
- Chauhan P, Shakya M (2009). Modeling signaling pathways leading to wrinkle formation: identification of the skin ageing target. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 75(5): 463-8.
- Chou YH, et al. (1990). Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin. *Cell* 62(6): p. 1063-71.
- Chu D (2008). Overview of biology, development, and structure of skin. In: Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrist B, Paller A, Leffell D, eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill;60.
- Chung-Ching Chu, Paola Di Meglio, and Frank O. Nestle (2011). Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol* 23(1): 28–41.
- Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie GE (2001). Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117(5): 1218-24.
- Chung JH, Seo JY, Lee MK, Eun HC, Lee JH, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ (2002). Ultraviolet modulation of human macrophage metalloelastase in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 119(2): 507-12.
- Chung JH, Yano K, Lee MK, Youn CS, Seo JY, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Detmar M (2002). Differential effects of photoaging vs intrinsic aging on the vascularization of human skin. *Arch Dermatol* 138(11): 1437-42.
- Chung JH, Seo JY, Lee MK, Eun HC, Lee JH, Kang S, et al. (2002). Ultraviolet modulation of human macrophage metalloelastase in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 119:507–12.
- Chung JH, Eun HC (2007). Angiogenesis in skin aging and photoaging. *J Dermatol* 34(9) : 593-600.
- Chung S (2012). Basal Cell Carcinoma. *Arch Plast Surg* 39(2): 166-70.

- Churukian CJ (2002). *Pigments and Minerals*. In: J.D. Bancroft and M. Gamble (Eds), *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th ed., Churchill Livingstone Harcourt Publishers Limited, London. pp. 243-67.
- Circolo A, Welgus HG, Pierce GF, Kramer J, Struck RC (1991). Differential regulation of the expression of proteinases: antiproteinases in fibroblasts. Effects of interleukin-1 and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 266(19):12283-8.
- Cleaver JE, Crowler E (2002). UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci* 7:d1024-d1043.
- Cochran AJ (1970). The incidence of melanocytes in normal skin. *J Invest Dermatol* 57: 38-43.
- Cook HC (1977). *Theory and Practice of Histological Techniques*. (Ed. By JD. Bancroft & A. Stevens). Churchill, Livingstone, London.
- Contet-Audonneau LJ, Jeanmaire C, Pauly G (1999). A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *British Journal of Dermatology* 140(6):1038-47.
- Costin GE, Hearing VJ (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 21(4): 976-94.
- Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T. (2004). Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. *Mutat Res* 556: 135-142.
- Covas D, Panepuccia R, Fontes A, et al. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular. *Exp Hematol* 36(5):642-54.
- Crawford L (1983). The 53,000-dalton cellular protein and its role in transformation. *Int Rev Exp Path* 25:1-50.
- Craven NM, Watson RE, Jones CJ, Shuttleworth CA, Kielty CM, Griffiths CE (1997). Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *Br J Dermatol* 137(3): 344-350.
- Crane D, Masters C (1984). On the role of catalase in the oxidation of tissue fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 229(1):104-111.
- Creamer JD, Barker JN (1995). Vascular proliferation and angiogenic factors in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. 20(1):6-9. Review.
- Crisan D, Lupsor M, Boca A, Crisan M, Badea R (2012). Ultrasonographic assessment of skin structure according to age. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 78(4):519.
- Živančević-Simonović S, Đukic A, Inić-Kanada A, Dimitrijević LJ (2004). The oxidative stress in pathophysiology of immune system. *Medicus* 5(2): 11-6.
- Čajkovac M (2005). *Kozmetologija*. 2. izdanje. Jastrebarsko: Naklada slap.
- Dai G, Freudenberg T, Zipper P et al. (2007). Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol* 171(5):1451-61.
- Daniels TE (1984). Human mucosal Langerhans cells: postmortem identification of regional variations in oral mucosa. *J Invest Dermatol* 82(1):21-24.
- Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, et al. (2006). Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 130:2060-2073.
- Dargel R (1992). Lipid peroxidation-a common pathogenic mechanism? *Experimental and Toxicologic Pathology* 44(4): 169-181.
- Das DK, Maulik N (2004). Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. *Biochemistry* 69(1):10-17.
- Dayer JM, Beutler B, Cerami A (1985). Cachectin: tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162(6):2163-8.
- DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel R J, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M (2004). Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 164(4):1131-9.
- De Fabo EC (2005). Arctic stratospheric ozone depletion and increases UVB radiation: potential impact to human health. *Int J Circumpolar Health* 64(5):509-22.
- De Gruijl F R (2002). Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15(5), 316-20.
- De Rosa G, Staibano S, Barra E et al. (1993). p53 protein in aggressive and non-aggressive basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 20(5):429-34.
- Delo VA, Dawes L, Jackson R (1981). Density of Langerhans cells (LC) in normal vs. chronic actinically damaged skin (CADS) of humans. *J Invest Dermatol* 76:330-1.
- Demir B, Adabag A, Ozturk N, Gunes M (2006). Effects of hormone replacement therapy and tibolone on skin thickness and bone in postmenopausal women. *Ann Saudi Med* 26 (2):161-2.
- Demirkan NC, Colakoglu N, Düzcan E (2000). Value of p53 protein in biological behavior of basal cell carcinoma and in normal epithelia adjacent to carcinomas. *Pathol Oncol Res* 6(4):272-4.
- Dennison DK, Van Dyke TE (1997). The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 14(1):54-78.
- Detmar M (2003). Molecular mechanisms of skin angiogenesis and lymphangiogenesis and their significance for melanoma progression. *Pigment Cell Research* 16(5): 580-581.
- Detmar M, Yeo KT, Nagy JA, Van de Water L, Brown LF, Berse B, Elicker BM, Ledbetter S, Dvorak HF (1995). Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*. 105(1):44-50.
- Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, et al. (1994). Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 180:1141-1146.
- Devary Y, Gottlieb RA, Smeal T, Karin M (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71(7):1081-1091.

- DiFranco CF, Toto PD, Rowden G, Gargiulo AW, Keene JJ, et al. (1985). Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. *J Parodontol* 56(1):48-54.
- De Leeuw SM, Smit NP, Van Veldhoven M, Pennings EM, Pavel S, Simons JW, Schothorst AA (2001). Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J Photochem Photobiol Biol* 61(3): 106-113.
- Dimri GP et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(20): 9363-9367.
- Dong SE, Young LJ, Lee S, Sun KM, Gon LB, Seoup CI, et al. (2005). Topical application of 17 β -estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating TGF- β signaling in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 124(6):1149-61.
- Doljanski F (2004). The Sculpturing Role of Fibroblast-Like Cells in Morphogenesis. *Perspectives in Biology and Medicine* 47(3): 339-356.
- Dostanić I, Dostanić N, Magić Z (2000). Fototerapija. In: Karadaglić Đ, ed. Dermatologija. Beograd: Vojnoizdavački zavod, 1425-1437.
- Drake LA, et al. (1995). Guidelines of care for actinic keratoses: Committee on Guidelines of Care. *J Am Acad Dermatol*. Jan;32(1):95-8.
- Du Toit DF, Kleintjes WG, Otto MJ, Mazyala EJ, Page BJ (2007). Soft and hard-tissue augmentation with platelet-rich plasma: Tissue culture dynamics, regeneration and molecular biology perspective. *Int J Shoulder Surg* 1:64-73.
- Dumas M, Langle S, Noblesse E, Bonnet-Duquennoy M, Pelle de Queral D, Tadokoro T, et al. (2005). Histological variation of Japanese skin with aging. *Int J Cosmet Sci* 27(1):47-50.
- Duval C, Régnier M, Schmidt R (2001). Distinct melanogenic response of human melanocytes in monoculture, in co-culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV exposure. *Pigment Cell Research* 14(5): 348-55.
- Dunn LB, Damesyn M, Moore A, Reuben DB, Greendale GA (1997). Does estrogen prevent skin aging? *Arch Dermatol* 133(3): 339-42.
- Duval C, Smit NPM, Kolb AM, Régnier M, Pavel S, Schmidt R (2002). Keratinocytes Control the Pheo/Eumelanin Ratio in Cultured Normal Human Melanocytes. *Pigment Cell Research* 15(6): 440-46.
- Dvorak HF (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma growth and wound healing. *New England Journal of Medicine* 315, 1650–1659.
- Душкин МИ (2012). Макрофар/пенистая клетка как атрибут воспаления: механизмы образования и функциональная роль // Биохимия, Т. 77.С. 419-32.
- Đukić MM (2008). Oksidativni stres. *Mono i Manjana*, Beograd.
- Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG (2000). Biohemija slobodnih radikala, Niš, Medicinski fakultet.
- Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6(7):1899–904.
- Edwards DR, Leco KJ, Beaudry PP, Atadja PW, Veillette C, Riabowol KT (1996). Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp Gerontol* 31(1-2): 207-23.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 80(6), 1298-1307.
- Effros RB (1998). Replicative senescence in the immune system: impact of the Hayflick limit on T-cell function in the elderly. *Am J Hum Genet* 62(5): 1003-7.
- Egles C, Huet HA, et al. (2010). Integrin-blocking antibodies delay keratinocyte reepithelialization in a human three-dimensional wound healing model. *PLoS One* 5(5): e10528.
- El-Abaseri TB, Putta S, Hansen LA (2006). Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis*. 27:225–231.
- El Ghalbzouri A, Lamme E, et al. (2002). Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res* 310 (2):189-99.
- El-Domyati S, Attia F, Saleh D, Brown DE, Birk F, Gasparro H, Ahmad J, Uitto (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental Dermatology* 11(5): 398–405.
- El-Domyati S, Attia F, Saleh D et al. (2003). Expression of p53 in Normal Sun-exposed and Protected Skin (Type IV –V) in Different Decades of Age. *Acta Derm Venereol* 83(2): 98–104.
- Elias PM (1996). Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. *Exp Dermatol* 5(4):191–201.
- Elias PM (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *British Journal of Dermatology* 125(2), 183-200.
- Elias PM (2012). Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. *J Invest Dermatol*. 132(9):2131-3.
- Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Chenesh DA (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular Cell* 4(6), 915–24.
- Eller MS, Ostrom K, Gilchrist BA (1996). DNA damage enhances melanogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(3):1087-1092.
- Enerback L, Wingren U (1980). Histamine content of peritoneal and tissue mast cells of growing rats. *Histochemistry* 66(2):113–124.
- Engelke M, Jensen J-M, Ekanayake-Mudiyanselage S, Proksch E (1997). Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. *Brit J Derm* 137(2):219–225.

- Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, et al. (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* 111:1897-907.
- Enoch Stuart, Price Patricia, et al. (2004). Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds*.
- Ervin H, Epstein JR (1974). Alpha I (III), Human skin collagen: Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J. Biol. Chem.* 249:3225-31.
- Eckes B, Colucci-Guyon E, et al. (2000). "Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin." *J Cell Sci* 113 (Pt 13): 2455-2462.
- Epstein, EH Jr. (1974). [α 1(III)]₃ Human skin collagen, release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J. Biol. Chem.* 249: 3225–3231.
- Evelson P, Ordonez CP, Llesuy S, Boveris A (1997). Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J Photochem Photobiol Biol* 38(2): 215-219.
- Fallowfield ME, Curley RK and Cook MG (1991). Melanocytic lesions and melanocyte populations in human epidermis. *Br J Dermatol* 124 pp. 130–134.
- Farage AM, Miller W, Elsner P, Maibach HI (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin aging: A review. *Int J Cosmet Sci* 30:87-95.
- Farage Miranda A, Miller Kenneth W, Maibach Howard I (2010). *Textbook of Aging Skin*. Springer.
- Fathke C, Wilson L, Hutter J, et al. (2004). Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 22(5):812–822.
- Fatima B. Serinkan, Yulia Y. Turina, Mirjana Đukić, Alan Schroit, Valerian E. Kagan (2004). Vitamin E inhibits anti-Fas induced phosphatidylserine oxidation but does not affect its externalization during apoptosis in Jurkat T cells and their phagocytosis by 1774A.1 macrophages. *Antioxidans& redox signaling* 6(2):227-5.
- Fenske NA, Lober CW (1986). Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol* 15: 571–585.
- Ferrara, N (2000). VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 617–24.
- Ferrara N (2004). VEGF: basic science and clinical progress. *Endocrine Rev* 25:581–611.
- Ferreira T, Rasband WS (2012). "ImageJ User Guide — IJ 1.46", imagej.nih.gov/ij/docs/guide/.
- Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX (1991). Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol* 37(8):823–9.
- Fichard A, Tillet E, Delacoux F, Garrone R, Ruggiero F (1997). Human recombinant alpha1(V) collagen chain. Homotrimeric assembly and subsequent processing. *J Biol Chem* 272(48):30083-87.
- Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Shao Y, Datta S, Wang ZQ, Kang S, Voorhees JJ (2001). Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117: 219–26.
- Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379(6563): 335-9.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337: 1419-28.
- Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 138 : 1462-70.
- Fisher GJ, Quan T, et al. (2009). Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am J Pathol* 174(1): 101-14.
- Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ (2008). Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol* 144(5):666–72.
- Fithian E, Kung PC, Goldstein G, Rubenfeld M, Fenoglio C et al. (1981). Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(4):2541-44.
- Fitzpatrick TB (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.* 124(6):869-71.
- Fitzgerald J, Rich C, Zhou FH et al. (2008). Three novel collagen VI chains, α 4(VI), α 5(VI) and α 6(VI). *J Biol Chem*; 283(29): 20170–80.
- Frandberg PA, Doufexis M, Kapas S, Chhajlani V (1998). Human pigmentation phenotype: a point mutation generates non-functional MSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 245(2):490-2.
- Francis MK, Appel S, Meyer C, Balin SJ, Balin AK, Cristofalo VJ (2004). Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging in vivo. *J Invest Dermatol* 122: 1096-105.
- Freinkel and D. T. Woodley (2001). *The Biology of the Skin*. CRC Press LLC.
- Fung CY, Fisher DE (1995). p53: from molecular mechanisms to prognosis in cancer. *J Clin Oncol* 13: 808 -11.
- Fujita M et al (1991). Regional Development of Langerhans Cells and Formation of Birbeck Granules in Human Embryonic and Fetal Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 97, 65–72.
- Foote A, Kipen Y, Santos L, Leech M, et al. (2004). Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 31: 268–273.
- Gago N, Perez-Lopez V, Sanz-Jaka JP, et al. (2009). Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells* 27(5):1164-72.
- Galli SJ (2000). Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 7: 32–9.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, et al. (2005a). Mast cells as 'tunable' effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23:749-86.
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M (2005b). Mast cells in the development of adaptive immune response. *Nat Rev Immunol* 6(2):135-42.

- Galli SJ, Tsai M (2008). Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci* 49(1): 7–19.
- Gambichler T, Tigges C, Scola N, Weber J, Skrygan M, Bechara F, Altmeyer P, Kreuter A (2011). Etanercept plus narrowband ultraviolet B phototherapy of psoriasis is more effective than etanercept monotherapy at 6 weeks. *Br J Dermatol*; 164(6): 1383-86.
- Garrone R, Lethias C, Le Guellec D (1997). Distribution of minor collagens during skin development. *Microsc Res Tech* 38(4):407-12.
- Gerber HP, Dixit V, Ferrara N (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 273(21) :13313-6.
- Ghersetich et al. (1994). Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int J Dermatology* 33 (2): 119-122.
- Gibson SJ, Farrell M. (2004). A review of age differences in the neurophysiology of nociception and the perceptual experience of pain. *Clinical journal of pain*, 20(4): 227-39.
- Gilchrist BA, Stoff JS, Soter NA (1982a). Chronologic aging alters the response to ultraviolet-induced inflammation in human skin. *J Invest Dermatol* 79(1):11–15.
- Gilchrist BA, Murphy GJ, Soter NA (1982). Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans' cells in human epidermis. *J Invest Dermatol* 79(2):85–88.
- Gilchrist BA (1993). Aging of skin. In: Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., Wolff K, Freedberg I.M., Austen K.F., editors. *Dermatology in general medicine*. New York:McGraw-Hill, 150-7.
- Gilchrist BA (1996). A review of skin aging and its medical therapy. *Br J Dermatol* 135(6):867-75.
- Gilchrist BA, Blog FB, Szabo G (1979). Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol* 73(2):141–43.
- Gilchrist BA. (1984). Skin and aging processes. CRC Press. Boca Raton. pp 97-117.
- Gille J, Swerlick RA, Caughman SW (1997). Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J* 16: 750–759.
- Gillery P, Fertin C, Nicolas JF, Chastang F, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX (1992). Interleukin-4 stimulates collagen gene expression in human fibroblast monolayer cultures. Potential role in fibrosis. *FEBS Lett* 302(3):231–4.
- Gilfillan AM, Tkaczyk C (2006). Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 6(3):218-30.
- Gilhar A, Ullmann Y, Karry R, et al. (2004). Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase. *Br J Dermatol* 150(1):56–63.
- Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7(3), 265-73.
- Гетлинг З (2002). Ультраструктура эпидермиса и его барьерная функция/З.Гетлинг//Эстетическая медицина. №3. –С. 208-214.
- Gloster NM Jr, Neal K (2006). Skin cancer in skin of color. *J AM Acad Dermatol* 55(5):741-60.
- Gniadecka M, Jemec GBE (1998). Quantitative evaluation of chronological ageing and photoageing in vivo. Studies on skin echogenicity and thickness. *British Journal Of Dermatology*. 139(5): 815-21.
- Gogly B, Godeau G, Gilbert S, et al. (1997). Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingival in relation to age. *Clin Oral Invest*. 1:147–52.
- Goldsmith LA i sar. (2012). Fitzpatrick's Dermatology in General medicine 8th Edition.
- Goihman-Yahr M. (1996). Skin aging and photoaging: An outlook. *Clinics in Dermatology*, 14(2): 153-160.
- Горелова МВ (2010). Пролиферативная активность интерфолликулярного эпидермиса кожи височной области мужчин 20–45 лет. *Морфология* Т. 137(4): 59.
- Gordon MK, Olsen BR (1990). The contribution of collagenous proteins to tissue-specific matrix assemblies. *Curr Opin Cell Biol* 2(5):833-8.
- Gordon S (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3(1): 23-35.
- Gordon S (2007). The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37: (Suppl 1):9-17.
- Goerdt S, Orfanos CE (1999). Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10:137-42.
- Godar DE (1999). UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol* 112(1): 3-12.
- Goldstein S (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249(4973): 1129-33.
- Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eissen AZ. (1986). Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 261:6600-5.
- Gonzales Maglio DH, Paz ML, Ferrari A, Weill FS, Czerniczyniec A, Leoni J, Bustamante J (2005). Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21(6): 311-7.
- Goodpaster T, Legesse-Miller A, Hameed MR, Aisner SC, Randolph-Habecker J, Collier HA (2008). An Immunohistochemical Method for Identifying Fibroblasts in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *J Histochem Cytochem*. 56(4): 347–58.
- Gosain A, DiPietro LA (2004). Aging and wound healing. *World J Surg* 28(3): 321-6.
- Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller M, Nehal U, Gilchrist B (2000). Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J* 14(10): 1325-34.
- Goyarts E, Muizzuddin N, Maes D, Giacomoni PU (2007). Morphological changes associated with aging: Age spots and the microinflammatory model of skin aging. *Ann N Y Acad Sci* 1119: 32-9.

- Griffiths CEM, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ (1993). Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *New Engl J Med* 329(8):530–5.
- Grimaldeston MA, Metz M, Yu M, Tsai M, Galli SJ (2006). Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated acquired immune responses. *Curr Opin Immunol* 18(6):751–60.
- Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381): 1309–12.
- Grove GL, Kligman AM (1983). Age associated changes in human epidermal cell renewal. *J Gerontol* 38(2): 137–42.
- Greinert R, Boguhn O, et al. (2000). The dose dependence of cyclobutane dimmer induction and repair in UVB-irradiated human keratinocytes. *Photochem Photobiol* 72(5): 701–8.
- Green KJ, Simpson CL (2007). Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 127(11): 2499–515.
- Grewe M. (2001). Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. *Clin Exp Dermatol*. 26(7):608–12.
- Grimaldeston MA, Finlay-Jones JJ, Hart PH (2006). Mast cells in photodamaged skin: what is their role in skin cancer? *Photochem Photobiol Sci* 5(2): 177–83.
- Gruber BL, Marchese MJ, Kew R (1995). Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 86:2488–93.
- Gunin AG, Kornilova KN, Vasiliev VO, Petrov VV (2011). Age-Related Changes in Proliferation, the Numbers of Mast Cells, Eosinophils, and cd45-Positive Cells in Human Dermis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66(4):385–92.
- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 124: 175–189.
- Gurish MF, Boyce JA (2002). Mast cell growth, differentiation, and death. *Clin Rev Allergy Immunol*. 22(2):107–18.
- Gutteridge JMC (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interac* 91(2-3):133–40.
- Haake AR, Holbrook K (1999). The Structure and Development of Skin. In: T.B. Fitzpatrick, I.M. Freedberg, et al. (Eds), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 5th ed., pp. 70–114. Vol. 1. McGraw-Hill, New York.
- Haake A, Scott GA, Holbrook KA (2000). Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis, in The Biology of the Skin (Freinkel RK and Woodley DT eds), pp 19–45, The Parthenon Publishing Group, New York.
- Ha RY, Nojima K, Adams WP Jr, Brown SA (2005). Analysis of facial skin thickness: Defining the relative thickness index. *Plast Reconstr Surg* 115(6):1769–73.
- Hall G, Phillips TJ (2005). Estrogen and skin: The effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol* 53(4):555–68.
- Halder RM, Bridgman-Shan S (1995). Skin cancer in African Americans. *Cancer* 75 (2 Suppl): 667–73.
- Halliday GM, Agar NS, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Jones AM (2005). UV-A fingerprint mutations in human skin cancer. *Photochem Photobiol* 81(1):3–8.
- Halliday GM, Byrne SN, Damian DL (2011). Ultraviolet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis. *Semin Cutan Med Surg* 30(4):214–21.
- Halliday GM (2005). Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res* 571(1-2): 107–20.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology* 186:1–85.
- Halliwell B (1995). Active oxygen in biochemistry. Blackie Academic&Professional, London 313–35.
- Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants and human: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344 (8924):721–24.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford 29–32.
- Hara M, Yaar M, Byers HR, Goukassian D, Fine RE, Gonsalves J, Gilchrist BA (2000). Kinesin Participates in Melanosomal Movement Along Melanocyte Dendrites. *Journal of Investigative Dermatology* 114(3): 438–43.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345 (6274): 458–60.
- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3): 298–300.
- Harman D (2006). Free-radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* Vol. 1067: 10–21.
- Hammerberg C, Duraiswamy N, Cooper KD (1994). Active induction of unresponsiveness (tolerance) to DNFB by in vivo ultraviolet exposed epidermal cells is dependent upon infiltrating class II MHC + CD11b bright monocytic/macrophagic cells. *J Immunol* 153:4915–24.
- Harrist TJ, Muhlbauer JE, Murphy GF, Mihm MC, Bhan AK (1983). T6 is superior to Ia (HLA-DR) as a marker for Langerhans cells and indeterminate cells in normal epidermis: a monoclonal study. *J Invest Dermatol* 80(2):100–103.
- Hart PH, Grimaldeston MA, Hosszu EK, Swift GJ, Noonan FP, Finlay-Jones JJ (1999). Age-related changes in dermal mast cell prevalence in BALB/c mice: functional importance and correlation with dermal mast cell expression of Kit. *Immunology* 98(3):352–56.
- Hart PH, Grimaldeston MA, Jaksic A et al. (2000). Ultraviolet B-induced suppression of immune responses in interleukin-4–/– mice: relationship to dermal mast cells. *J. Invest. Dermatol*. 114: 508–13.
- Hart PH, Townley S, Grimaldeston M, Khalil Z, Finlay-Jones JJ (2002). Mast cells, neuropeptides, histamine, and prostaglandins in UV-induced systemic immunosuppression. *Methods* 28(1): 79–89.
- Hasanzadeh P, Oveisgharan S, Sedighi N, Nafissi S (2008). Effect of skin thickness on sensory nerve action potential amplitude. *Clin Neurophysiol* 119(8):1824–8.
- Хавинсон ВХ, Кветной ИМ, Ингель ИЭ, Марьянович АТ (2003). Возрастная инволюция органов и тканей. Успехи физиол. наук. 34(1): 79.
- Hayflick L (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37(3):614–36.

- Hawk JLM. Cutaneous photobiology. In: Champion RH, Burton JL, Ebling FJG (eds) (1992). Textbook of Dermatology Vol 2 London: Blackwell Scientific Publications: 849-66.
- Heib V, Becker M, Warger T, Rechtsteiner G, Tertilt C, Klein M, Bopp T, Taube C, Schild H, Schmitt E, Stassen M (2007). Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* 110(3): 946-53.
- Helbig D, Paasch U (2011). Molecular changes during skin aging and wound healing after fractional ablative photothermolysis. *Skin Res Technol* 17(1): 119-28.
- Hendi A, Brodland DG, Zitelli JA (2006). Melanocytes in long-standing sun-exposed skin: quantitative analysis using the MART-1 immunostain. *Arch Dermatol*. 142(7):871-6.
- Hendi Ali, David A. Wada, et al. (2011). Melanocytes in nonlesional sun-exposed skin: A multicenter comparative study. *Journal of the American Academy of Dermatology* Volume 65, Issue 6: Pages 1186-1193.
- Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805): 770-777.
- Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M (2001). Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 10(1):1-10.
- Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure MJ, Titeux M, Tonasso L, Quillet-Mary A, Baudouin C, Charveron M, Laurent G (2006). Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation. Implication of granzyme B and perforin. *J Biol Chem* 281(19): 13525-32.
- Heier I, Soyland E, Krogstad AL, Rodriguez-Gallego C, Nenseter MS, Jahnsen FL (2011). Sun exposure rapidly reduces plasmacytoid dendritic cells and inflammatory dermal dendritic cells in psoriatic skin. *Br J Dermatol* 165: 792-801.
- Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K (1993). UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol* 2:92-97.
- Herrera B, Alvarez AM, Sanchez A (2001). Reactive oxygen species (ROS) mediate the mitochondrial-dependent apoptosis induced by hepatocytes. *FASEB J* 15(3): 741-51.
- Хертель Б (2000). Молекулярные и клеточные механизмы естественного старения и фотостарения (стрессорные факторы, защитные механизмы) // *Косметика и медицина*. 4: 5-17.
- Hide M, Yanase Y, Greaves MW (2007). Cutaneous mast cell receptors. *Dermatol Clin*; 25(4): 563-75.
- Hirako Y, Usukura J, Nishizawa Y, Owaribe K (1996). Demonstration of the molecular shape of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen and its potential for trimer formation. *J Biol. Chem.* 271 (23): 13739-45.
- Hirakawa S, Fujii S, Kajiya K, Yano K, Detmar M (2005). Vascular endothelial growth factor promotes sensitivity to ultraviolet B-induced cutaneous photodamage. *Blood* 105:2392-2399.
- Hirobe T (2011). How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell Melanoma Res* 24:462-78.
- Hitzig C, Monteil RA, Charbit Y, Teboul M (1989). Quantification of T6+ and HLA:DR+ Langerhans cells in normal and inflamed human gingiva. *J Biol Buccale* 17(2):103-108.
- Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M (2001). Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 166(9): 5448-55.
- Hodes RJ (2005). Aging and the immune system. *Current Opinion in Immunology* 17(5): 455-6.
- Hogaboam CM, Steinhilber ML, Chensue SW, Kunkel SL (1998). Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int* 54(6):2152-59.
- Hoi AY, Morand EF, Leech M (2003). Is macrophage migration inhibitory factor a therapeutic target in systemic lupus erythematosus? *Immunol. Cell Biol* 81:367-373.
- Howell BG, Wang B, Freed I, et al. (2004). Microarray analysis of UVB-regulated genes in keratinocytes: downregulation of angiogenesis inhibitor thrombospondin-1. *J Dermatol Sci*. 34(3):185-94.
- Holbrook KA, Odland GF (1974). Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis. *Journal of Investigative Dermatology* 62(4), 415-22.
- Holbrook KA, Hoff MS. Structure of the developing human embryo and fetal skin. *Semin Dermatol* 1984; 3: 185-202.
- Holbrook KA, Wolff K (1993). The structure and development of the skin. In: Fitzpatrick TB, editor. *Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw- Hill; pp. 97-145.
- Hornebeck W (2003). Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol* 51(10): 569-73.
- Hsu-Wong S, Katchman S, Ledo I, Uitto J (1994). Tissue-specific and developmentally regulated expression of human elastin promoter activity in transgenic mice. *J Biol Chem* 269(27):18072-5.
- Hughes FJ, Culloch CA (1991). Quantification of chemotactic response of quiescent and proliferating fibroblasts in Boyden chambers by computer-assisted image analysis. *J. Histochemistry and Cytochemistry* pp. 243-4.
- Hughes VA, Roubenoff R, Wood M, Frontera WR, Evans WJ, Fiatarone Singh MA (2004). Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am J Clin Nutr* 80(2): 475-82.
- Huggenberger R, Siddiqui SS, Brander D, Ullmann S, Zimmermann K, Antsiferova M, et al. (2011). An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation. *Blood* 117:4667-4678.
- Huggenberger Reto and Michael Detmar (2011). The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *J Investig Dermatol Symp Proc* 15(1):24-32.
- Hu J (2001). Oxidative Stress and Aging. Free Radical and Radiation Biology Program. The University of Iowa.
- <http://rsbweb.nih.gov/ij/> Image Processing and Analysis in Java (ImageJ) download site.
- Hull MT, Warfel KA (1983). Age-related changes in the cutaneous basal lamina: scanning electron microscopic study. *J Invest Dermatol*. 81(4): 378-80.

- Humbert P, Sainthillier JM, Mac-Mary S, et al. (2005). Capillaroscopy and videocapillaroscopy and assessment of skin microcirculation: dermatologic and cosmetic approaches. *J Cosmetic Dermatol*. 4:153–162.
- Iddamaloda A, Le QT, Ito K, Tanaka K, Kojima H, Kido H (2008). Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins. *Arch Dermatol Res* 300(suppl 1):S69–S76.
- Iijima N, Linehan MM, Saeland S, Iwasaki A (2007). Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *Proc Nat Acad Sci USA*. 104(48):19061–19066.
- Inaba K, Inaba M (2005). Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *Int J Hemat* 81(3):181-7.
- Imokawa G (2004). Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 17:96–110.
- Имаева НА, Потееаев НН, Ткаченко СБ и др. (2008). Особенности нарушения микроциркуляции при различных типах старения кожи //Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 3: 107–110.
- Inamura H, Kurosawa M, Okano A et al. (2002). Expression of the interleukin-8 receptors CXCR1 and CXCR2 on cord-blood-derived cultured human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 128:142–50.
- Inomata S, Matsunaga Y, Amano S, Takada K, Kobayashi K, Tsunenaga M et al. (2003). Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol* 120(1):128–34.
- Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB (1989). Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 37(10):1509-15.
- Irani AM, Goldstein SM, Wintroub BU, Bradford T, Schwartz LB (1991). Human mast cells carboxypeptidase. Selective localization to MCTC cells. *J Immunol* 147:247-53.
- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320:84–5.
- Iuchi S, Green H (1997). Nuclear localization of basonuclin in human keratinocytes and the role of phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(15): 7948–53.
- Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology* 189(1-2): 21-39.
- Ichihashi M et al. (2009). Photoaging of the skin. *Anti-Aging Medicine* 6 (6): 46-59.
- Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T (2009). Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination. *Int J Legal Med* 123:299–304.
- Ishikawa T, Kodama K, Matsumoto J, Takayama S (1984). Photoprotective role of epidermal melanin granules against ultraviolet damage and DNA repair in guinea pig skin. *Cancer Res* 44:5195–5199.
- Jackson SM, Williams ML, Feingold KR, et al. (1993). Pathobiology of the stratum corneum. *West J Med* 158(3):279–85.
- Jahoda C, Reynolds A (1996). Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatol Clin* 14(4):573–83.
- Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT (1993). Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 69(3):261-74.
- Jenkins G (2002). Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev* 123(7), 801-10.
- Jeevan A, Bucana CD, Dong Z, Dixon VV, Thomas SL, Lloyd TE. and Kripke ML (1995). Ultraviolet radiation reduces phagocytosis and intracellular killing of mycobacteria and inhibits nitric oxide production by macrophages in mice. *J. Leukoc. Biol.* 57, 883–890.
- Jenkins RH, Thomas GJ et al. (2004). Myofibroblastic differentiation leads to hyaluronan accumulation through reduced hyaluronan turnover. *J Biol Chem* 279(40): 41453-60.
- Jimbow K, Fitzpatrick TB, Quevedo WC Jr (1986). Formation, Chemical Composition and Function of Melanin Pigments. In: J. Bereiter-Hahn, A.G. Matoltsy, et al. (Eds), *Biology of the Integument*, 2nd ed. Vol. II pp. 278-92 Vertebrates. Springer-Verlag, Berlin.
- Jimbow K, Quevedo WC, Jr, Prota G, Fitzpatrick TB (1999). Biology of Melanocytes. In: Fitzpatrick, TB, Freedberg, IM et al. (Eds). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 5th international ed., pp. 192-219. Vol. 1. McGraw-Hill, New York.
- Joerger AC, Ang HC, Fersht AR (2006). Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(41): 15056–61.
- Johnson LA, Clasper S, Holt AP, Lalor PF, Baban D, Jackson DG (2006). An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium. *J Exp Med* 203(12), 2763-77.
- Joyce NC, Haire MF, Palade GE (1985). Contractile proteins in pericytes. II Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J Cell Biol* 100(5):1387-95.
- Jones, Philip H. et al. (2007). Sic Transit Gloria: Farewell to the Epidermal Transit Amplifying Cell? *Cell Stem Cell* , Volume 1 , Issue 4 , 371 – 381.
- Jovanović M, Jovićić A, Ivanović L, Černak I, Mršulja BB (1994). Free radicals in MPTP-Induced Parkinsonism. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta* 30(3):197-203.
- Jung U Shin, Won Jai Lee, Sang Ho Oh, Do Young Kim, Dae Suk Kim, Inhee Jung, Ju Hee Lee MD (2014). Altered vimentin protein expression in human dermal microvascular endothelial cells after ultraviolet or intense pulsed light treatment. *Lasers in Surgery and Medicine* Vol 46 Issue 5: 431-438.
- Junqueira Luiz Carlos, Carneiro Jose (2005). *Basic Histology: Text & Atlas*. McGraw-Hill.

- Jurić-Lekić G, Bradamante Ž, Švajger A (1984). Vlakna elastičnog sustava u koži čovjeka *Acta dermatovenerologica Iugoslavica* (0302-4466) **11** 175-83.
- Jurić-Lekić G (2005). Koža. U: Bradamante Ž, Kostović-Knežević L, ur. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; str. 369-81.
- Jurić-Lekić G (2008). Kožni sustav. U: Bradamante Ž, Grbeša Đ, ur. Langmanova medicinska embriologija. Zagreb: Školska knjiga; str. 337-40.
- Juhl M, Stoltze K, Reibel J (1988). Distribution of Langerhans cells in clinically healthy human gingival epithelium with special emphasis on junctional epithelium. *Scand J Dent Res* 96(3):199-208.
- Kadakara AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA (2003). Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res* 16(5):434-47.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6(5):199-213.
- Kajiya K, Kunstfeld R, Detmar M, Chung JH (2007). Reduction of lymphatic vessels in photodamaged human skin. *J Dermatol Sci* 47:241-243.
- Kajiya K, Detmar M (2006). An important role of lymphatic vessels in the control of UVB-induced edema formation and inflammation. *J Invest Dermatol* 126:919-921.
- Kajiya K, Hirakawa S, Detmar M (2006). Vascular endothelial growth factor-A mediates ultraviolet B-induced impairment of lymphatic vessel function. *Am J Pathol* 169:1496-1503.
- Kajiya K, Sawane M, Huggenberger R, Detmar M (2009). Activation of the VEGFR-3 pathway by VEGF-C attenuates UVB-induced edema formation and skin inflammation by promoting lymphangiogenesis. *J Invest Dermatol* 129:1292-1298.
- Kakasheva-Mazhenkovska L, Milenkova L, Kostovska N, Gjokik G (2011). Histomorphometrical characteristics of human skin from capillitium in subjects of different age. *Sec Biol Med Sci MASA*, XXXII, 2, Prilozi. 32(2):105-18.
- Kakizaki I, Itano N, Kimata K, Hanada K, Kon A, Yamaguchi M, Takahashi T, Takagaki K. (2008). Upregulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *Arch Biochem Biophys* 471: 85-93.
- Kalluri R, Zeisberg M (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6:392-401.
- Kališnik M (1985): Temelji stereologije. *Acta Stereol* 4:59-81.
- Kambayashi H, Otake Y, Takada K, Funasaka Y, Ichihashi M (2003). Involvement of changes in stratum corneum keratin in wrinkle formation by chronic ultraviolet irradiation in hairless mice. *Exp Dermatol* 12: 22-7.
- Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. (2001). VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *The American journal of gastroenterology* 96:822-828.
- Kang K, Gilliam AC, Chen G, Tootell E, Cooper KD (1998). In human skin, UVB initiates early induction of IL-10 over IL-12 preferentially in the expanding dermal monocytic/macrophagic population. *J Invest Dermatol* 111:31-8.
- Kang S, Chung JH, Lee JH, Fisher GJ, Wan YS, Duell EA, Voorhees JJ (2003). Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 120(5): 835-41.
- Kanda N, Watanabe S (2003). 17b-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol* 121:1500-09.
- Kanitakis J (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12(4):390-9.
- Kanitakis J, Morelon E, Petruzzo P et al. (2011). Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Exp Dermatol* 20(2):145-6.
- Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S et al. (2005). Epidermal Langerhans cell deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23:611-20.
- Karadaglić Đ i sar. (2000). Dermatologija. Beograd: Vojnoizdavački zavod.
- Kasahara S, Aizawa K, Okamiya M, Kazuno N, Mutoh S, Fugo H, Cooper EL and Wago H. (2001). UVB irradiation suppresses cytokine production and innate cellular immune functions in mice. *Cytokine* 14, 104-111.
- Katzberg AA (1985). The area of the dermo-epidermal junction in human skin. *Anat Rec* 131:717.
- Качахидзе ТН (1970). Состояние структуры рыхлой соединительной ткани в процессе старения организма человека (в пожилом, старческом возрастах и возрасте долголетия) : автореф. дис. . канд. мед. наук / Т.Н. Качахидзе. – Тбилиси.
- Kauser S, Schallreuter KU, Thody AJ, Gummer C, Tobin DJ (2003). Regulation of Human Epidermal Melanocyte Biology by Beta-Endorphin. *Journal of Investigative Dermatology* 120(6): 1073-80.
- Kauser S, Westgate GE, Green MR, et al. (2011). Human hair follicle and epidermal melanocytes exhibit striking differences in their aging profile which involves catalase. *J Invest Dermatol* 131:979-82.
- Kautz-Neu K, Noordegraaf M, Dinges S et al. (2011). Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response. *J Exp Med* 208:885-91.
- Kawada Akira (2011). Protection and Therapy of Photoaging. *Anti-Aging Medicine* 8 (6) : 88-91.
- Kelly RI, Pearce R, Bull RH, Leveque JL, de Rigal J, Mortimer PS (1995). The effects of aging on the cutaneous microvasculature. *J Am Acad Dermatol* 33: 749-56.
- Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruij FR, Bouwes Bavinck JN (2003). Leiden Skin Cancer Study. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol*. 120(6):1087-93.
- Kenny GP, Journeay WS (2010). Human thermoregulation: separating thermal and nonthermal effects on heat loss. *Front Biosci* 15:259-290.

- Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 71: 357–70.
- Kielty CM, Shuttleworth, CA (1997). Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc Res Tech*. 38(4): 413–27.
- Kierszenbaum L, Abraham, Tres L. Laura (2002). Histology and Cell Biology - An Introduction to Pathology, 3rd ed.. Saunders, an imprint of Mosby, Inc.
- Kim SY, Kim SJ, et al. (2004). Protective effects of dietary soy isoflavones against UV-induced skin-ageing in hairless mouse model. *J Am Coll Nutr* 23(2):157-62.
- Kim MS, Kim YK, Eun HC et al. (2006). All-trans retinoic acid antagonizes UV-induced VEGF production and angiogenesis via the inhibition of ERK activation in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* 126:2697–706.
- Kim MS, Kim YK, Lee DH, Seo JE, Cho KH, Eun HC, Chung JH (2009). Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin in vivo. *Br J Dermatol*. 160(2): 393-402.
- Kim YG, Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y (2009). Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur J Pharmacol* 602:148–56.
- Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B et al. (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22:643–54.
- Klareskog L, Tjernlund UM, Forsum U, Peterson PA (1977). Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268:248-250.
- Kligman AM (1969). Early destructive effects of sunlight on human skin. *J Am Med Assoc* 210:2377-80.
- Kligman LH (1982). Intensification of ultraviolet-induced dermal damage by infrared radiation. *Arch Dermatol Res* 272: 229-38.
- Kligman LH (1987). Full spectrum solar radiation as a cause of dermal photodamage: UVB to infrared. *Acta Derm Venereol Stockholm* 134:53–61.
- Kligman LH, Gebre M, Alper R, Kefalides NA (1989). Collagen metabolism in ultraviolet irradiated hairless mouse skin and its correlation to histochemical observations. *Invest Dermatol* 913:210-12.
- Kligman LH (1996). The hairless mouse model for photoaging. *Clin Dermatol* 14: 183-95.
- Kligman LH, Schwartz E, Sapadin AN, Kligman AM (2000). Collagen loss in photoaged human skin is overestimated by histochemistry. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 16(5):224-8
- Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G (1997). The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 272: 7608–16.
- Knight JA (2000). Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci Spring* 30(2):145-158.
- Ko MS, Marinkovich MP (2010). Role of dermal-epidermal basement membrane zone in skin, cancer, and developmental disorders. *Dermatol Clin* 28:1-16.
- Kochevar IE, Pathak MA, Parrish JA (1999). Photophysics, Photochemistry, and Photobiology. In: T.B. Fitzpatrick, I.M. Freedberg, et al. (Eds), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 5th international ed., pp. 220-29. Vol. 1. McGraw-Hill, New York.
- Kosmadaki MG, Yaar M, Arble BL, Gilchrist BA (2003). UV induces VEGF through a TNF-alpha independent pathway. *FASEB J* 17:446-8.
- Kubo A, Nagao K, Yokouchi M et al. (2009). External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med* 206:2937–46.
- Kondo S (1999). The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4: 177-83.
- Kondo S, Yoneta A, Yazawa H, Kamada A, Jimbow K (2000). Down regulation of CXCR-2 but not CXCR-1 expression by human keratinocytes by UVB. *J Cell Physiol*. 182(3): 366-70.
- Kondo S (2000). The roles of cytokines in photoaging. *Journal of Dermatological Science* 23(Suppl. 1): 30–6.
- Korn JH (1981). Modulation of lymphocyte mitogen responses by cocultured fibroblast. *Cell Immunol* 63(2):374–84.
- Kosmadaki B, Gilchrist (2004). // Micron Vol. 35, № 3. - P. 155-159.
- Koster MI (2009). Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci* 1170: 7-10.
- Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM (2011). Skin ageing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25: 873–84.
- König A, Bruckner-Tuderman L (1991). Epithelial-mesenchymal interactions enhance expression of collagen VII in vitro. *J Invest Dermatol* 96: 803–8.
- Kripke ML (1988). Impact of ozone depletion on skin cancer. *J Dermatol Surg Oncol* 14:853-57.
- Krtolica A, Campisi J (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol*. 34(11):1401-14.
- Kubo Y, Urano Y, Yoshimoto K et al. (1994). p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol* 102:440-44.
- Kueper T, Grune T, Prahl S, Lenz H, Welge V, Biernoth T, et al. (2007). Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *J Biol Chem* 282:23427–36.
- Kueper T, Grune T, Muhr GM, Lenz H, Wittern KP, Wenck H, et al. (2008). Modification of vimentin: a general mechanism of nonenzymatic glycation in human skin. *Ann N Y Acad Sci* 1126:328–32.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN (2010). Robbinsove osnove patologije, osmo izdanje. Data Status Beograd.
- Kurokawa I, Takahashi K, Moll I, Moll R (2011). Expression of keratins in cutaneous epithelial tumors and related disorders--distribution and clinical significance. *Exp Dermatol* 20:217-28.
- Kvam E, Tyrrell RM (1997). Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 18: 2379-84.

- Кичигина ТН, Грушин ВН, Беликова ИС, Мяделец ОД (2007). Меланоциты: строение, функции, методы выявления, роль в кожной патологии // *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 6(4): 5-16.
- Laga AC, Murphy GF (2009). The translational basis of human cutaneous photoageing: on models, methods, and meaning. *Am J Pathol* 174(2): 357-60.
- LaBranche H, et al. (1998). Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nature Genet* 19: 199-202.
- Lalević-Vasić B, Medenica LJ, Nikolić M (2003). Dermatovenerologija sa propedeutikom. Savremena administracija Beograd.
- Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Sturzebecher J, Mann K, et al. (2000). Expression and proteolysis of VEGF is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 115:12-8.
- Laurent A, Mistretta F, Bottiglioli D, et al. (2007). Echographic measurement of skin thickness in adults by high frequency ultrasound to assess the appropriate microneedle length for intradermal delivery of vaccines. *Vaccine* 25 (34):6423-30.
- Lavker RM (1979). Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 73(1):59-66.
- Lavker RM, Kligman AM (1988). Chronic heliodermatitis: a morphological evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J Invest Dermatol* 90: 325 – 30.
- Lavker RM, Zheng PS, and Dong G. (1989). Morphology of aged skin. *Clin Geriatr Med* 5: 53-67.
- Lavker RM, Gerberick GF, Veres D, Irwin CJ, Kaidbey KH (1995). Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J Am Acad Dermatol*. 32(1):53-62.
- LeBaron RG, Zimmermann DR, Ruoslahti E (1992). Hyaluronate binding properties of versican. *J. Biol. Chem.* 267, 10003–10010.
- Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C (2005). Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol*; 17: 313–8.
- Leon Albertine et al. (2009). Mast cells and dendritic cells in basal cell carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 50(1):85–90
- Levakov A, Vučković N, Đolai M, Mocko Kačanski M, Božanić S (2012). Age-related skin changes. *Med Pregl LXV* (5-6): 191-95.
- Levine N (1993). Pigmentation and Pigmentary Disorders. Boca Raton: CRC Press, p 1–553.
- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA (1988). Text-Atlas of Histology. Philadelphia, WB Saunders
- Lee W, McCulloch CA (1997). Deregulation of collagen phagocytosis in aging human fibroblasts: Effects of integrin and cell cycle. *Experiment cell research* 237(2): 383-93.
- Lee CM, Weindrich R, Aiken JM (1997). Age-associated alteration of the mitochondrial genome. *Free Radic Biol Med* 22: 1259-69.
- Lee Y, Hwang K (2002). Skin thickness of Korean adults. *Surg Radiol Anat* 24 (3-4):183-9.
- Lee D, Cho K (2005). The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in threedimensional culture systems. *Arch Dermatol Res* 296:296–302.
- Lee HC, Wei YH (2000). Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* 7(1):2-15.
- Leino L, Saarinen K, Kiviso K, Koulou L, Jansen CT and Punnonen K. (1999). Systemic suppression of human peripheral blood phagocytic leukocytes after whole-body UVB irradiation. *J. Leukoc. Biol.* 65, 573–582.
- Lever WF, Schaumburg-Lever G (1983). In: Histopathology of the skin, 6th ed. Philadelphia: Lippincott, 29-30.
- Lever WF (2005). Histopathology of the Skin Ed. D.Elder.-9th Ed.-Philadelphia, 597-600.
- Lewis KG, Bercovitch L, Dill SW, Robinson-Bostom L (2004). Acquired disorders of elastic tissue: part I. Increased elastic tissue and solar elastotic syndromes. *J Am Acad Dermatol* 51: 1-21.
- Liang S, Ohtsuki Y, Furihata M, Takeuchi T, Iwata J, Chen B, et al. (1999). Sun-exposure and aging dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumor cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Arch* 434(3): 193 –9.
- Lin JY, Fisher DE (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445(7130): 843-50.
- Li L, Mac-Mary S, Sainthillier JM, Nouveau S, de Lacharrière O, Humbert P (2006). Age-related changes of the cutaneous microcirculation in vivo. *Gerontology* 52, 142-53.
- Li L, Tucker RW, Hennings H, et al. (1995). Inhibitors of the intracellular Ca(2+)-ATPase in cultured mouse keratinocytes reveal components of terminal differentiation that are regulated by distinct intracellular Ca2+ compartments. *Cell Growth Differ* 6(9):1171-84
- Lipozenčić J (2004). Dermatovenerologija. Medicinska naklada Zagreb.
- Lipozenčić J, Ljubojević S (2004). Identification of Langerhans cells in dermatology. *Arh Hig Rada Toksikol* 55(2-3): 167-74.
- Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis* 14(4): 549-69.
- Liu B, Zhu F, Xia X, Park E, Hu Y (2009). A tale of terminal differentiation. *Cell Cycle* 8(4):527-31.
- Lopez H, Beer JZ, Miller SA, Zmudzka BZ (2004). Ultrasound measurements of skin thickness after UV exposure: a feasibility study. *J Photochem Photobiol B* 73(3):123-32.
- Lotze MT, Thomson AW (2001). Dendritic Cells, 2 Ed. Academic Press, San Diego.
- Loser K, Mehling A, Loeser S et al. (2006). Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med* 12:1372–9.
- Lock-Andersen J, Therkildsen P, de Fine Olivarius, et al. (1997). Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 13:153.
- Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, et al. (2008). Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol* 17:925–32.

- Lovell, CR, Smolenski, KA, Duance, VC, Light, ND, Young, S, Dysons, M (1987). Type I and III collagen content in normal human skin during aging. *Br J Dermatol* 117: 419–428.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175–84.
- Luo Y, Toyoda M, Nakamura M, Morohashi M (2002). Morphological analysis of skin in senescence-accelerated mouse P10. *Med Electron Microsc* 35:31–45.
- Ma W, Wlaschek M, Tancheva-Poor I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K (2001). Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the connective tissue. *Clin Exp Dermatol* 26(7): 592–99.
- Ma W, Hommel C, Brenneisen P, et al. (2003). Long-term growth arrest of PUVA-treated fibroblasts in G2/M in the absence of p16(INK4a) p21(CIP1) or p53. *Exp Dermatol* 12:629–37.
- MacLaughlin J, Holick MF (1985). Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest* 76: 1536–8.
- Mac-Mary S, Sainthillier JM, Jeudy A, Sladen C, Williams C, Bell M, Humbert P (2010). Assessment of cumulative exposure to UVA through the study of asymmetrical facial skin aging. *Clin Interv Aging*. 5:277–84.
- Madden Katherine, Forman B Seth, Elston Dirk (2011). Quantification of melanocytes in sun-damaged skin. *Journal of the American Academy of Dermatology* 64(3):548–52.
- Makrantonaki E, Brink TC, Zampeli V, Elewa RM, Mlody B, et al. (2012). Identification of Biomarkers of Human Skin Ageing in Both Genders. Wnt Signalling - A Label of Skin Ageing? PLoS ONE 7: e50393. doi:10.1371/journal.pone.0050393.
- Malaviya R, Abraham SN (1998). Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *J Mol Med* 76:617–23.
- Malvy J, Guinot C, Preziosi P et al. (2000). Epidemiologic determinants of skin photoaging: baseline data of the SU.VI.MAX. cohort. *J Am Acad Dermatol* 42:47–55.
- Mammone T, Gan D, Reyhaneh F (2006). Apoptotic cell death increases with senescence in normal human dermal fibroblast cultures. *Cell Biol Int* 30:903–9.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677–86.
- Manuskianti W, Maibach HI. (1996). Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging. *Int. J. Dermatol.* 35:539–544.
- Марголина АА (2005). Липидный барьер кожи и косметические средства. У Эрнандес ЕИ, Марголина АА, Петрухина М. ООО «НАУКА МЕДИЦИНА ВЕТЕРИНАРИЯ».
- Марголина АА (2001). Гормональные проблемы в косметологии. *Косметика и медицина*.5:47–57.
- Марголина АА (2001). Фотостарение кожи-профилактика и лечение. *Косметика и медицина* 2: 44–53.
- Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 322(4):1111–1122.
- Marks R (1992). Sun-damaged skin. London: Martin Dunitz
- Marks DB, Marks AD, Smith CM (1996). Oxygen metabolism and oxygen toxicity. Basic medical biochemistry: A clinical approach. Lippincott Williams & Wilkins, 327–40.
- Marks R (2004). The stratum corneum barrier: the final frontier. *J Nutr* 134(8 Suppl): 2017S–2021S.
- Marks MS, Seabra MC (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:738–48.
- Marmur E, Amir I (2007). Effective Treatments of Photodamage US *Dermatology Review* 42–45.
- Marionnet C, Pierrard C, Vioux-Chagnoleau C, et al. (2006). Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 126:971–79.
- Marionnet C, Pierrard C, Lejeune F, Sok J, Thomas M, et al. (2010) Different oxidative stress response in keratinocytes and fibroblasts of reconstructed skin exposed to non extreme daily-ultraviolet radiation. PLoS One 5:e12059.
- Marković T (2011). Evaluation of glucocorticoid induced atrophy on reconstructed skin models. Graduation thesis. Ljubljana.
- Marjanović D (2010). Морфометријска студија лимфоцитних субпопулација и антиген-презентујућих ћелија гингиве оболелих од пародонтопатије. Doktorska disertacija. K.Mitrović.
- Marrot L, Meunier JR (2008). Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* 58: 39–48.
- Massari LP, Kastelan M, Gruber F (2007). Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. *Coll Antropol Suppl* 1:83–5.
- Matsuoka LY, Uitto J (1989). Alterations in the elastic fibers in cutaneous aging and solar. elastosis. In: Balin AK, Kligman Am, eds. *J Am Acad Dermatol* 21:638–644.
- Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS (2001). eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circ Res* 89:793–798.
- Matsumura Y, Ananthaswamy HN (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 195:298–308.
- Mathias CG, Maibach HI (1982). Perspectives in occupational dermatology. *West J Med* 137:486–492.
- Mathers AR, Larregina AT (2006). Professional antigen presenting cells of the skin. *Immunol Res* 36: 127–36.
- Matts PJ, Fink B (2010). Chronic sun damage and the perception of age, health and attractiveness. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 9, 421–431.
- Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S (1984). Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* 3(13):3257–62.
- Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, Bischoff SC, Bienenstock J et al. (2003). What is the physiological function of mast cells? *Ex Dermatol* 12:886–910.

- Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, von Stebut E (2006). Skin mast cells control T cell-dependent host defense in Leishmania major infections. *FASEB J.* 20:2460-7.
- Mauviel A (1993). Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 53:288–95.
- Mazyala EJ (2008). A morphological study of the dermal fibroblast. Thesis (MScMedSc (Biomedical Sciences. Anatomy and Histology))--University of Stellenbosch.
- Мяделец ОД, Адашкевич ВП (2006). Морфофункциональная дерматология. М.: Медицинская литература 734 с.
- McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM (2008). Anatomy and organization of human skin. Y: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C (Eds.), Rook's textbook of dermatology, Seventh Edition, Blackwell Publishing, Inc., Malden, Massachusetts, USA, pp. 45-128.
- McGrath JA, Uitto J (2010). Anatomy and organization of human skin. Y: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C (Eds.), Rook's textbook of dermatology, Eighth Edition, Blackwell Publishing, Inc., Malden, Massachusetts, USA, Chapter 3.
- McLafferty E, Hendry C, Alistair F (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs Stand.* 27:35-42.
- McLoone P. and Norval M. (2005). Adaptation to the UV-induced suppression of phagocytic activity in murine peritoneal macrophages following chronic exposure to solar simulated radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 783–788.
- McManus JF and Mowry RW (1960). Staining methods histological and histochemical. Paul Hoeber Inc. New York.
- Mehta RC, Fitzpatrick RE (2007). Endogenous growth factors as cosmeceuticals. *Dermatol. Ther.* 20(5): 350-359.
- Melnikova VO, Ananthaswamy HN (2005). Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mut Res* 571:91-106.
- Melov S, Lithgow GJ, Fischer DR, Tedesco PM, Johnson TE (1995). Increased frequency of deletions in the mitochondrial genome with age in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* 23: 1419-25.
- Menon GK, Cleary GW, Lane ME (2012). The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm* 435:3-9.
- Merad M, Manz MG, Karsunky H et al. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3:1135–41.
- Merker HJ (1994). Morphology of the basement membrane. *Microsc Res Tech.* 28:95–124
- Metz M, Grimaldeston MA, Nakae S et al (2007). Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 217:304–28.
- Metz M, Lammel V, Gibbs B F et al. (2006). Inflammatory Murine Skin Responses to UV-B Light Are Partially Dependent on Endothelin-1 and Mast Cells. *Am J Pathol* 169(3): 815–822.
- Meunier L, Bata-Csorgo Z, Cooper KD (1995). In human dermis, ultraviolet radiation induces expansion of a CD36 + CD11b + CD1-macrophage subset by infiltration and proliferation; CD1+ Langerhans-like dendritic antigen-presenting cells are concomitantly depleted. *J Invest Dermatol* 105:782–8.
- Midwood KS, Schwarzbauer JE (2002). Elastic fibers: building bridges between cells and their matrix. *Curr Biol* 12(8): R279-R281.
- Miller and S. Gay (1987). The collagens - an overview and update. *Methods in Enzymology* 144:3-41.
- Mirza R, DiPietro LA, and Koh TJ (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *American Journal of Pathology* 175 (6) pp. 2454–2462.
- Miller AJ, Tsao H (2010). Insights into pigmentation and cancer. *Br J Dermatol* 162:22-8.
- Mimeault M, Batra SK (2010). Recent advances on skin-resident stem/ progenitor cell functions in skin regeneration, aging and cancers and novel anti-aging and cancer therapies. *J Cell Mol Med* 14:116–134.
- Mimić-Oka J, Simić T, Đukanović L, Reljić Z, Davičević Z (1999). Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 51(4): 233-41.
- Miot HA, Brianezi G, Tamega AA, Miot LDB (2012). Techniques of digital image analysis for histological quantification of melanin. *An Bras Dermatol.* 87(4):597-607.
- Middeldkamp-Hup MA et al. (2006). RCM Detects UV-Induced Pigmentary Epidermal Changes. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 402–407.
- Misterska M, Szulczynska-Gabor J, Zaba R. (2009). Aetiopathogenesis, clinical picture and treatment of vitiligo. *Postep Derm Alergol* 26:212–23.
- Misery L (1997). Skin, immunity and the nervous system. *Br J Dermatol.* 137(6):843-50. Review.
- Mitchell RE (1969). Chronic solar dermatosis: An electron microscopic study of the epidermis. *Aust J Dermatol* 10: 75–91.
- Mladenović T, Pavlović MD (2000). Starenje i koža. In: Karadaglić Đ, ed. *Dermatologija*. Beograd: Vojnoizdavački zavod. 90-96.
- Mohamed Badawy Abdel-Naser , Marwa Abdallah, Hiram Larangeira de Almeida Jr, Uwe Wollina (2005). Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. *Egyptian Dermatology Online Journal* Vol. 1 No 2:1-25.
- Molendijk A, Van Gurp RJ, Donselaar IG, et al. (1987). Suppression of delayed-type hypersensitivity to histocompatibility antigens by ultraviolet radiation. *Immunology* 62:299-305.
- Moles JP, Moyret C, Guillot B i sar. (1993). P53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene* 8:583-8.
- Mollah ZU, Aiba S, Manome H, Yoshino Y, Tagami H (2002). Cord Blood CD34+ Cells Differentiate into Dermal Dendritic Cells in Co-Culture with Cutaneous Fibroblasts or Stromal Cells. *J Invest Dermatol* 118:450-460.
- Mommaas AM, Mulder AA, Vermeer M, Boom BW, Tseng C, Taylor JR, Streilein JW (1993). Ultrastructural studies bearing on the mechanism of UVB-impaired induction of contact hypersensitivity to DNCB in man. *Clin Exp Immunol* 92(3):487–493.
- Montagna W, Carlisle K (1990). Structural changes in ageing skin. *Br J Dermatol* 122 (suppl 35):61–70.

- Morales CP, et al. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genet* 21: 115-118.
- Morita A, Werfel T, Stege H, Ahrens C, Karmann K, Grewe M, Grether-Beck S, Ruzicka T, Kapp A, Klotz LO, Sies H, Krutmann J (1997). Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J Exp Med* 186: 1763-68.
- Mori L, Bellini A, Stacey MA, Schmidt M, Mattoli S (2005). Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res* 304:81-90.
- Moriwaki S, Ray S, Tarone RE, Kraemer KH, Grossman L (1996). The effect of donor age on the processing of UV damaged DNA by cultured human cells: reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability. *Mutat Res* 364: 117 – 123.
- Morris NP, Keene DR, Glanville RW, Bentz H, Burgeson RE (1986). The tissue form of type VII collagen is an antiparallel dimer. *J Biol Chem.* 261(12):5638-44.
- Morel F, Doussiere J, Vignais PV (1991). The superoxide generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201: 523-546.
- Moran DT, Rowley JC (1988). Visual Histology [e-book] USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Mullauer L, Gruber P, Sebingner D, Buch J, Wohlfart S, Chott A (2001). Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 488: 211-231.
- Mosser DM (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73:209-12.
- Murphy GF, Bhan AK, Sato S, Harist TJ, Mihm MC (1981). Characterization of Langerhans cells by the use of monoclonal antibodies. *Lab Invest* 5:465-468.
- Murphy G, Allan JA, Willenbrock F, Cockett MI, O'Connell JP, Docherty AJ (1992). The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem.* 15:267(14):9612-8.
- Muto J, Kuroda K, et al. (2007). Accumulation of elastin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elastin binds to elastin and prevents elastolytic degradation. *J Invest Dermatol* 127(6): 1358-66.
- Naito M (1993). Macrophage Heterogeneity in Development and Differentiation. *Arch Histol Cytol* 56(4):331-51.
- Naito M (2008). Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int* 58(3):143-55.
- Naru E, Ohta T, Inomata K, Hayashi A, Kaji K (2009). Donor age-dependent acceleration of cellular aging by repeated ultraviolet A irradiation of human dermal fibroblasts derived from a single donor. *Hum Cell* 22:31-37.
- Narbutt J et al. (2004). Exposure to low doses of solar-simulated radiation induces an increase in the myeloid subtype of blood dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* 60, 429-435.
- Neerken S, Lucassen GW, Bisschop MA, Lenderink E, Nuijs TA (2004). Characterization of age-related effects in human skin: A comparative study that applies confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 9(2): 274-81.
- Newcomb GM, Powell RN (1986). Human gingival Langerhans cells in health and disease. *J Periodontal Res* 21: 640-52.
- Nica Luminita, Raica Marius (2008). Immunohistochemical Localization of Dendritic Cells in Human Dental Pulp. *Acta Stomatol Croat.* 42(3):235-241.
- Nigro JM, Aldape KD, Hess SM, Tlsty TD (1997). Cellular adhesion regulates p53 protein levels in primary human keratinocytes. *Cancer Res* 57:3635-39.
- Nikolić V (1990). Koža, integumentum commune. U: Krmpotić-Nemanić J, ur. Anatomija čovjeka. Zagreb: JUMENA str. 101-5.
- Nikolić I i sar. (2007). Embriologija čoveka: tekst i atlas. Data status, Niš.
- Nilsson G, Butterfield JH, Nilsson K et al (1994). Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. *J Immunol* 153:3717-23.
- Nissinen MJ, Panula P (1995). Developmental patterns of histamine-like immunoreactivity in the mouse. *J Histochem Cytochem* 43:211-227.
- Nolte SV, Xu W, Rennekampff HO, Rodemann HP (2008). Diversity of Fibroblasts. A Review on Implications for Skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 187(3):165-76.
- Noonan FP, Kripke ML, Pedersen GM, et al. (1981). Suppression of contact hypersensitivity in mice by ultraviolet irradiation is associated with defective antigen presentation. *Immunology* 43:527-33.
- Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP (1998). The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology. New York: Oxford University Press, p 1-1025.
- Norbury KC, Kripke ML and Budmen MB. (1977). In vitro reactivity of macrophages and lymphocytes from ultraviolet-irradiated mice. *J. Natl Cancer Inst.* 59, 1231-1235.
- Norris PG, Gange RW, Hawk JLM: Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds.) (1993). *Dermatology in General Medicine* McGraw-Hill, New York, pp 1651-1658.
- Norris A (2004). Targeting mast cells. *Expert Opin on Investig Drugs.* 13(7): 739-41.
- Nouri K (2008). Skin cancer (1st ed.). NY: McGraw-Hill Companies Inc.
- Ноздрин ВИ, Алексеев АГ, Белоусова ТА (2011). Возрастные особенности представительства меланоцитов в волосяных фолликулах кожи височной области головы у мужчин. *Морфология* № 3: 67-72.
- Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR, Becker TC, Modlin RL (2008). "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol.* 128(9):2225-31.
- Odland G (1991). Structure of skin. In: Goldsmith, L. A. (eds), *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*, Oxford University Press, Oxford.
- Oikarinen A, Kallioinen M (1989). A biochemical and immunobiochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin. *Photodermatol* 6: 24-31.

- Oikarinen A (1994). Aging of the skin connective tissue: how to measure the biochemical and mechanical properties of aging dermis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 10: 47-52.
- Okayama Y, Ra C, Saito H (2007). Role of mast cells in airway remodeling. *Curr Opin Immunol* 19:687-93.
- Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Petre A, Mounawar M, Plymoth A, et al. (2009). Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 16:1-12.
- Oliver H, Ferguson J, Moseley H (2007). Quantitative risk assessment of sunbeds: impact of new high power lamps. *Br J Dermatol* 157(2):350-6.
- Olsen DR, Peltonen J, Jaakkola S, Chu ML, Uitto J (1989). Collagen gene expression by cultured human skin fibroblasts. Abundant steady-state levels of type VI procollagen messenger RNAs. *J Clin Invest*. 83(3):791-5.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006). VEGF receptor. Signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell* 7:359-71.
- Olsson N, Piek E, ten Dijke P et al. (2000). Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor-beta family. *J Leukoc Biol* 67:350-6
- Omary MB et al. (2006). "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci* 31(7): 383-94.
- Орасмяз Т, Глаголева Е. (2011). Улучшение микроциркуляции кожи как часть эстетической коррекции внешних проявлений старения. Э К С П Е Р И М Е Н Т А Л Ь Н А Я И К Л И Н И Ч Е С К А Я Д Е Р М А Т О К О С М Е Т О Л О Г И Я № 3; 43-47.
- Ouhtit A, Ananthaswamy HN (2001). A Model for UV-Induction of Skin Cancer. *J Biomed Biotechnol* 1(1): 5-6.
- Ou-Yang H, Stamatas G, Kollias N (2009). Dermal contributions to UVA-induced Oxidativ stress in skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 25: 65-70.
- Overall CM (2001). Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol Biol* 151: 79-120.
- Pablos JL, Carreira PE, Serrano L, Del Castillo P, Gomez-Reino JJ (1997). Apoptosis and proliferation of fibroblasts during postnatal skin development and scleroderma in the tight-skin mouse. *J Histochem Cytochem* 45:711-719.
- Papa S. and Skulachev VP. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell. Biochem.* 174, 305-319.
- Papel ID, Larrabee W, Holt G, Park S, Sykes J. (2002). Facial Plastic and reconstructive Surgery, second edition- Thieme Medical Publisher.
- Papanagiotou VD (2009). Skin aging nad photoaging. *ΔέρμαDerma* 4: 57-65.
- Parry DA (2005). Microdissection of the sequence and structure of intermediate filament chains. *Adv Protein Chem* 70: 113-42.
- Paravina M i sar (2006). Dermatovenerologija, Prosveta. Niš.
- Parsonage G et al. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol* 26:150-6.
- Paus R, Theoharides TC, et al. (2006). Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'. *Trends Immunol* 27(1): 32-9.
- Pašić A, Dobrić I, Paljan D (1998). Maligni epidermalni tumori kože. u: Dobrić i i sar. Dermatovenerologija. 2. izd. Zagreb: grafoplast.: 403-8.
- Pearse AD, Gaskell SA, Marks R (1987). Epidermal Changes in Human Skin Following Irradiation With Either UVB or UVA. *J Invest Dermatol* 88: 83-87.
- Pearse R, Bull, RH, Kelly RI et al. (1994). Quantitative comparison of skin microvascular architecture. *International Journal of Microcirculation Clinical and Experimental* 14, 249.
- Persson YA, Blomgran-Julinder R, Rahman S, Zheng L, Stendahl O (2008). Mycobacterium tuberculosis-induced apoptotic neutrophils trigger a proinflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, acting in synergy with the bacteria. *Microbes Infect* 10(3):233-240.
- Pellacani G, Seidenari S (1999). Variations in facial skin thickness and Echogenicity with site and age. *Acta Derm Venerol* 79:366- 9.
- Pendergrass WR, Lane MA, Bodkin NL, et al. (1999). Cellular proliferation potential during aging and caloric restriction in rhesus monkeys (Macaca mulatta). *J Cell Physiol* 180:123-130.
- Pepić I, Sinovčić T, Filipović-Grčić J (2011). Hormonsko starenje kože. *Farmaceutski glasnik* 67, 1/2011.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L and Montesano R (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 902-906.
- Petersson S, Shubbar E, Enerbäck L, Enerbäck C (2009). Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions. *Melanoma Res.* 19(4):215-25.
- Petrović A (2001). Planimetrijsko-kariometrijska analiza seboroične i solarne keratoze i bazo- i spinocelularnih carcinoma kože. Magistarska teza. Niš.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 28(6):622-9.
- Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A (2005). Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 571:19-31.
- Pillai S, Oresajo C, Hayward J (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degeneration – a review. *Int J Cosmet Sci* 27: 17-34.
- Piletić MV, Milić BLJ, Đilas SM (1992). Organska hemija I, Novi Sad

- Pinkus H, Mehregan AH (1981). In: A guide to histopathology 3rd ed. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Pinnell SR (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48:1-19.
- Pitigala-Arachchi A, Crane IJ, Scully C, Prime SS (1989). Epithelial dendritic cells in pathological human oral tissues. *J Oral Pathol Med* 18:11-16.
- Plewig G (1970). Regional differences of cell sizes in the human stratum corneum. II. Effects of sex and age. *British Journal of Dermatology* 54(1): 19-23.
- Plate KH, Breier G, Weich HA et al. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 359:845-848.
- Plopper G (2007). The extracellular matrix and cell adhesion, in Cells (eds Lewin B, Cassimeris L, Lingappa V, Plopper G). Sudbury, MA: Jones and Bartlett.
- Ponten F, Berne B, Ren ZP, et al. (1995). Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol* 105 (3): 402-6.
- Popović B (2004). Oksidativni stres i rezistentnost nekih korova na delovanje atrazina i metolahlora. Magistarska teza, Novi Sad.
- Postlethwaite AE, Raghow R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH (1988). Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol* 106:311-8.
- Postlethwaite AE, Seyer JM (1991). Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4. Identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70-88 and 89-122. *J Clin Invest* 87:2147-52.
- Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghow R (1992). Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest* 90:1479-85.
- Pourzand C, Tyrrell RM (1999). Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* 70: 380-90.
- Prives C, Gottifredi V (2008). The p21 and PCNA partnership: a new twist for an old plot. *Cell Cycle* 7:3840-46.
- Proksch E, Brandner JM, et al. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17(12): 1063-72.
- Puxeddu I, Piliponsky AM, Bachelet I, Levi-Schaffer F (2003). Mast cells in allergy and beyond. *Int J Biochem Cell Biol* 35 (12): 1601-7.
- Puizina-Ivić N (2009). Definicija tumora i karcinogeneza. U: Lipozenčić J, Pašić A, ur. Dermatološka onkologija. Zagreb: Medicinska naklada. 11-26.
- Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, et al. (2002). Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene* 21(19): 2991-3002.
- Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ (2002). Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 119(2): 499-506.
- Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ (2005). Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 280:8079-85.
- Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ (2009). Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Invest Dermatol Symp Proc* 14(1): 20-4.
- Quan T, Shao Y, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ (2010). Reduced Expression of Connective Tissue Growth Factor (Ctgf/Ccn2), Mediates Collagen Loss In Chronologically-Aged Human Skin. *J Invest Dermatol*. 130(2): 415-24.
- Quaglino DJ, Bergamini G, Boraldi F, Pasquali-Ronchetti I (1996). Ultrastructural and morphometrical evaluations on normal human dermal connective tissue - the influence of age, sex and body region. *Br J Dermatol* 134:1013-22.
- Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN (2006). Photoaging: Mechanisms and repair. *Journal of the American academy of dermatology* 55(1): 1-19.
- Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, De Baetselier P (2007). Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 19:454-9.
- Raj D, Brash DE, Grossman D (2006). Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol* 126:243-257.
- Rajabi MA, Rajabi P, Afshar-Moghaddam N (2006). Determination of p53 expression in basal cell carcinoma tissues and adjacent nontumoral epidermis from sun-exposed areas of the head and neck. *Arch Iran Med*. 9(1):46-8.
- Ramos MC, Steinbrenner H, Stuhlmann D, Sies H, Brenneisen P (2004). Induction of MMP-10 and MMP-1 in a squamous cell carcinoma cell line by ultraviolet radiation. *Biol Chem* 385: 75-86.
- Ramos-E-Silva M, Jacques CD (2012). Epidermal barrier function and systemic diseases. *Clinics in dermatology* 30(3): 277-9.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS (2001). Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells. *Journal of Cell Biology* 152(4): 809-23.
- Raposo G, Marks MS (2002). The Dark Side of Lysosome-Related Organelles: Specification of the Endocytotic Pathway for Melanosome Biogenesis. *Traffic* 3(4): 237-48.
- Rawlings AV, Scott LR, Harding CR, Bowser PA, (1994). Stratum corneum moisturization at the molecular level. *Journal of Investigative Dermatology* 103(5): 731-40.
- Rees JL (2004). The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* 75:739-51.
- Reibel J, Dabelsteen E, Kenrad B, Buschard K (1985). Pattern of distribution of T lymphocytes, Langerhans cells and HLA-DR bearing cells in normal human oral mucosa. *Scand J Dent Res* 93:513-521.

- Rebrova GA, Berzhitskaya VV, Vasilevsky VK, Timofeeva MV, Ho So San. (2003). Some factors of collagen aging in vivo and in vitro. *Biomeditsinskaya khimiya* vol: 49(2), 128-137.
- Reelfs O, Tyrrell RM, Pourzand C (2004). Ultraviolet a radiation-induced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF-kappaB in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 122: 1440-47.
- Raine-Fenning NJ, Brincat MP, Muscat-Baron Y (2003). Skin aging and menopause: implications for treatment. *Am J Clin Dermatol* 4:371-84.
- Reichrath J (2007). Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. *Exp Dermatol* 16(7): 618-25.
- Rhie G, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC, Chung JH (2001). Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117:1212-17.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie* 53: 430-42.
- Richard S, de Rigal J, Lacharriere O, Berardesca E, Leveque JL (1994). Noninvasive measurement of the effect of lifetime exposure to the sun on the aged skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 10: 164-9.
- Richter T, Peuckert C, et al. (2004). Dead but Highly Dynamic – The Stratum corneum Is Divided into Three Hydration Zones. *Skin Pharmacology and Physiology*. 17: 246-57.
- Riedl E, Stockl J, Majdic O, Scheinecker C, Knapp W, Strobl H (2000a). Ligation of E-cadherin on in vitro-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation. *Blood* 96(13): 4276-84.
- Riedl E, Stock JL, Majdic O, Rappersberger K, Knapp W, Strobl H (2000b). Functional involvement of E-cadherin in TGF-beta 1-induced cell cluster formation of in vitro developing human Langerhans-type dendritic cells. *J Immunol* 165(3):1381-86.
- Rigel D, et al. (2006). Photostability of UVA/UVB sunscreens under extreme tropical sun exposure. Presented at the 64th Annual Meeting of the American Academy of Dermatology, San Francisco, CA. P2623.
- Rijken F, Kiekens RC, Bruijnzeel PL (2005). Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin. *Br J Dermatol* 152: 321-8.
- Rittie L, Fisher GJ (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 1(4): 705-20.
- Rivera J, Gilfillan AM (2006). Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 117:1214-25.
- Rizos H, Becker TM, Holland EA. (2004). Cell cycle regulation in the melanocyte. In: Thomson JF, Morton DL, Kroon BBR, editors. Textbook of melanoma. Vol. 100. UK, London: Martin Dunitz Taylor & Francis Group; pp. 13-25.
- Robert L, Robert AM, Fulop T (2008). Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology* 9:119-33.
- Röck K., Fischer JW (2011). Role of the extracellular matrix in extrinsic skin aging. *Hautarzt* 62 (8): 591-7.
- Rodier F, Campisi J, Bhaumik D (2007). Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res.* 35(22):7475-84.
- Romani N, Ebner S, Tripp CH, Flacher V, Koch F. and Stoitzner P (2006). Epidermal Langerhans cells—Changing view on their function in vivo, *Immunology Letters*, 106: 119-125.
- Romani N et al. (2012). Changing Views of the Role of Langerhans Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 872-881.
- Ross Michael H. Pawlina Wojciech (2011). Histology: A Text and Atlas Lippincott Williams & Wilkins
- Rowden G, Lewis MG, Sullivan AK (1977). Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268:247-48.
- Rocquet C, Bonte F (2002). Molecular aspects of skin ageing: recent data. *Acta Dermatoven APA* 3:71-94.
- Robertson K, Rees JL (2010). Variation in epidermal morphology in human skin at different body sites as measured by reflectance confocal microscopy. *Acta Derm Venereol* 90(4):368-73.
- Robert L, Labat-Robert J, et al. (2009). Physiology of skin ageing. *Pathol Biol* (Paris) 57(4): 336-41.
- Rubin H (1997). Cell aging in vivo and in vitro. *Mech Ageing Dev* 98: 1-35.
- Ruggiero F, Roulet M, Bonod-Bidaud C (2005). Dermis collagens: beyond their structural properties. *J Soc Biol* 199(4):301-11.
- Ruddon R (2007). Cancer Biology, Fourth edition Oxford University Press.
- Ruifrok AC (1997). Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding *Anal Quant Cytol Histol* 107-120.
- Ryan TJ (1989). Structure and function of lymphatics. *Journal of Investigative Dermatology* 93 (2 suppl), 18S-24S.
- Ryan, TJ (1995). Exchange and mechanical properties of the skin. *Wound Repair and Regeneration* 3, 258 – 264.
- Ryan, TJ (2003). The cutaneous vasculature in normal and wounded neonatal skin. In: Hoath, S.B., Howard, I. (Eds.), Neonatal Skin; Structure and function, 2nd edition. Maibach Marcel Dekker Inc., New York, pp. 125 – 152.
- Ryan T (2004). The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. *Micron*; 35(3):161-71.
- Рукша ТГ, Аксененко МБ, Климина ГМ, Новикова ЛВ (2013). Внеклеточный матрикс кожи: роль в развитии дерматологических заболеваний. *Vestnik dermatologii i venerologii* 6: 32-9.
- Saaristo A, Tammela T, Farkkilä A, Kärkkäinen M, Suominen E, Yla-Herttuala S, Alitalo K (2006). VEGF-C accelerates diabetic wound healing. *Am J Pathol* 169(3):1080-7.
- Szabo G (1967). The regional anatomy of the human integument with special reference to the distribution of hair follicles, sweat glands and melanocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 252: 447-464.
- Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ (2004). Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* 43:326-335.

- Sanders JE, Goldstein BS, Leotta DF, Richards KA (1999). Image processing techniques for quantitative analysis of skin structures. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 59 : 167–180.
- Sarchio SN, Kok LF, O'Sullivan C, Halliday GM, Byrne SN (2012). Dermal mast cells affect the development of sunlight-induced skin tumours. *Experimental Dermatology* 21(4): 241–48.
- Sandjeu Y, Haftek M (2009). Desmosialin and other components of the epidermal extracellular matrix. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4: 23–30.
- Sasai Y, Kumano S, Takahashi M. and Nakano H (1978). Histochemical Quantification of Dopa Oxidase (Tyrosinase) Activity in Epidermal Melanocytes. *Histochemistry* 55(3): 235–43.
- Seabra MC, Barral DC (2004). The Melanosome as a Model to Study Organelle Motility in Mammals. *Pigment Cell Research* 17(2): 111–19.
- Sandby-Moller J, Wulf HC, Poulsen T (2003). Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits. *Acta Dermato-Venereologica* 83(6), 410–13.
- Sandberg, M, Tamminen, M, Hirvonen, H, Vuorio, E, Pihlajaniemi, T (1989). Expression of mRNAs coding for the 1 chain of type XIII collagen in human fetal tissues: comparison with expression of mRNAs for collagen types I, II, and III. *J Cell Biol* 109(3): 1371–9.
- Sandvik LF, Skarstein K, Sviland L, Svarstad E, Nilsen AE, Leivestad T, Jonsson R, Appel S (2014). CD11c(+) dendritic cells rather than Langerhans cells are reduced in normal skin of immunosuppressed renal transplant recipients. *Acta Derm Venereol* 94(2):173–8.
- Sasaki T, Akutsu N, Nishiyama T, Burgeson RE, Nishiyama T, Nakajima H (1996). Type XII collagen in human skin: studies on its localization with monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 289(1):62–4.
- Savić S (2011). Patohistološke i imunohistohemijske promene kože miševa izloženih ultravioletnom A zračenju. Doktorska disertacija. Kosovska Mitrovica.
- Sauder DN, Dinarello CA, Morhenen VB (1984). Langerhans cell production of interleukin-I. *J Invest Dermatol* 82(6):605–7.
- Seite S, Moyal D, Richard S, de Rigal J, Leveque JL, Hourseu C, Fourtanier A (1998). Effects of repeated suberythral doses of UVA in human skin. In: Protection of the Skin against Ultraviolet Radiation (eds A. Rougier and H. Schaefer) pp. 47–58. John Libbey Eurotext, Paris.
- Semenza GL. Targeting (2003). HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* ;3:721– 32.
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M. (2009). Cutaneous Aging. In: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH Landthaler M, eds. Braun-Falco's Dermatology. 3rd ed. Berlin: Springer,:1170–5
- Scheffler IE. (2007). Mitochondria. 2nd Edition Wiley Liss; NY, USA.
- Schiaffino MV (2010). Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J Biochem Cell Biol* 42(7):1094–104.
- Schumacher, B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann TJ (1998). Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors. *Circulation* 97: 645–650.
- Schwartz E, Cruickshank FA, Christensen CC, Perlish JS, Lebowitz M (1993). Collagen alterations in chronically sun-damaged human skin. *Photochem Photobiol* 58: 841–4.
- Schwarz A, Grabbe S, Aragane Y, Sandkuhl K, Riemann H, Luger TA et al. (1996). Interleukin 12 prevents ultraviolet B-induced local immunosuppression and overcomes UVB-induced tolerance. *J Invest Dermatol* 106:1187.
- Schwartz E, Sapadin AN, Kligman LH (1998). Ultraviolet B radiation increases steady-state mRNA levels for cytokines and integrins in hairless mouse skin: modulation by topical tretinoin. *Arch Dermatol Res* 290(3):137–44.
- Schwarz A, Noordegraaf M, Maeda A et al. (2010). Langerhans cells are required for UVR-induced immunosuppression. *J Invest Dermatol* 130(5):1419–27.
- Scott G (1995). Antioxidants the modern elixir? *Chem Britain* 31: 879–82.
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M. Cutaneous Aging. In: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, eds. Braun-Falco's Dermatology. 3rd ed. Berlin: Springer, 2009:1170–75.
- Schalkwijk J (2007). Cross-linking of elafin/SKALP to elastic fibers in photodamaged skin: too much of a good thing? *J Invest Dermatol*. 127(6):1286–7.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 268: 23824–9.
- Sheibani K, Tubbs RR (1984). Enzyme immunohistochemistry: Technical aspects. *Semin Diagn Pathol* 1:235–250.
- Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J, Sakamoto W (1996). Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immunohistochemical localization. *FEBS Lett* 381: 199–202.
- Schuler Gerold (1990). Epidermal Langerhans Cells. CRC Press.
- Seite S, Moyal D, Richard S, de Rigal J, Leveque JL, Hourseu C, Fourtanier A (1998). Effects of repeated suberythral doses of UVA in human skin. In: Protection of the Skin against Ultraviolet Radiation (eds A. Rougier and H. Schaefer) pp. 47–58. John Libbey Eurotext, Paris.
- Seite S, Colige A, Piquemal-Vivenot P, Montastier C, Fourtanier A, Lapiere C, Nusgens B. (2000). A full-UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against biological changes occurring in photoaging. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed* 16(4):147–55.
- Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, Godeau G (2006). Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20(8):980–7.
- Séauquier S, Godeau G, Brousse N (2000). Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased gingival tissues. *Arch Oral Biol* 45:441–52.

- Sell DR, Monnier VM (1995). Aging of long-lived proteins: extracellular matrix (collagens, elastins, proteoglycans) and lens crystallins. In: Aging. Ed. Masoro EJ, Oxford University Press, New York.
- Семкин ВИ (2001). Морфофункциональные изменения эпидермальных дифферонов при старении / В.И. Семкин // Клинич. геронтология. № 9.-С. 27-31.
- Siems WG, Sommerburg O, Mayer H, Grune T (1998). Die wichtigsten Radikalquellen in menschlichen Organismus. *Pharm Ztg* 143:11-25.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42, 717-27.
- Silbert JE (1993). Glycosaminoglycans and proteoglycans of skin. Fitzpatrick TB et al, *Dermatology in Internal Medicine*. 350-358.
- Silvestre J, Kenis PJ, et al. (2009). Cadherin and integrin regulation of epithelial cell migration. *Langmuir* 25(17): 10092-9.
- Silva IS, Higgins CD, Abramsky T, Swanwick MA, Frazer J, Whitaker LM, Blanshard ME, Bradshaw J, Apps JM, Bishop DT, Newton-Bishop JA, Swerdlow AJ (2009). Overseas sun exposure, nevus counts, and premature skin aging in young English women: a population-based survey. *Invest Dermatol* 129: 50-59.
- Simpson RM, Wells A, Thomas D, Stephens P, Steadman R, Phillips A (2010). Aging fibroblasts resist phenotypic maturation because of impaired hyaluronan-dependent CD44/epidermal growth factor receptor signaling. *Am J Pathol* 176:1215-28.
- Simon D, Wardlaw A, Rothenberg ME (2010). Organ-specific eosinophilic disorders of the skin, lung, and gastrointestinal tract. *J Allergy Clin Immunol* 126:3-13.
- Slater TF (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222(1):1-15.
- Skulachev VP (2004). Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group. *Aging Cell* 3, 17-19.
- Smith JG Jr, Davidson EA, Sams WM Jr, Clark RD (1962). Alterations in human dermal connective tissue with age and chronic sun damage. *J Invest Dermatol* 39: 347-50.
- Смирнова ИО (2004). Фотостарение кожи - молекулярные маркеры эпидермиса и дермы / И.О. Смирнова, И.М. Кветной // Успехи геронтологии. III5.-С77-85.
- Смирнова, ИМ, Кветной ИВ, Князькин СИ Данилов СБ (2005). Нейроиммуноэндокринология кожи и молекулярные маркеры ее старения / Деан 288 с.
- Smirnova IO, Kvetnoi IM, Anichkov N.M, Smirnova ON, Antonova IV (2005). Mast cells in photolesion of the skin and basal cell cancer associated with it, *Ark Patol* 67(5):26-29.
- Sontheimer RD, Stastny P, Nunez G (1986). HLA-D region antigen expression by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87:707-10.
- Sorg O, Antille C, et al. (2006). Retinoids in cosmeceuticals. *Dermatol Ther* 19(5):289-96.
- Sorrel J, Baber M, Caplan A (2003). Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell Tissue Res* 327:499-510.
- Sorrell JM, Caplan AI (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* 117(Pt 5): 667-75.
- Sorrell M, Caplan AI (2009). Fibroblasts – a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Molec Biol* 276:161-214.
- Sorrell J, Baber M, Caplan A (2004). Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J Cell Physiol* 200:134-145.
- Staker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, et al. (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7:186-91.
- Stan C, Cimpean A, Iordachescu D (2004). Cellular and molecular changes of psoriatic keratinocytes in response to UVA in vitro treatment. *Romanian J Biophys* 14(1-4): 1-12.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176: 287-92.
- Steenport M, Khan K.M.F, Du B et al. (2009). Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 Induce Macrophage MMP-9: Evidence for the Role of TNF- α and Cyclooxygenase-2. *J Immunol* 183:8119-8127.
- Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnait F, Knapp W (1977). Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268: 245-6.
- Stoitznier P, Pfaller K, Stossel H, Romani N (2002). A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol* 118: 117-25.
- Storey A, McArdle F, Friedmann PS et al (2005). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduce UVB- and TNF- α -induced IL-8 secretion in keratinocytes and UVB-induced IL-8 in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 124:248-55.
- Stephens P, Genever P (2007). Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Diseases* 13:1-10.
- Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E i sar. (2005). Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:180-6.
- Stricklin GP, Welgus HG (1983). Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Purification and biochemical characterization. *J Biol Chem* 258:12252-8.
- Strott C, Higashi (2003). Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about? *Journal of Lipid Research* 44:1268-1278.
- Struck HJ (1991). Biomechanics and aging. *Gerontology* 24:121-8.
- Strutz F, Okada H, Lo C, et al. (1995). Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130:393-405.

- Stupack DG, Cheresch DA (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 115 (Pt 19): 3729-38.
- Stuttgen G (1996). Historical observations. *Clin Dermatol* 14:135-42.
- Sunderkotter C, Kalden H., Luger T (1997). Aging and the skin immune system. *Arch Dermatol* 133: 1256-62.
- Sueki H, Telegan B, Murphy GF (1995). Computer-assisted threedimensional reconstruction of human dermal dendrocytes. *J Invest Dermatol* 105: 704-8.
- Sudel KM, Venzke K, Mielke H et al. (2005). Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem Photobiol* 81: 581-587.
- Svobodova A, Psotova J, et al. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 147(2): 137-45.
- Tadokoro T, Yamaguchi Y, Batzer J, Coelho SG, Zmudzka BZ, Miller SA, Wolber R, Beer JZ, Hearing VJ. (2005). Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 124(6):1326-32.
- Tagami H (2008). Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. *Arch Dermatol Res* 300(Suppl 1): S1-S6.
- Takahashi, K., Naito, M. i Takeya, M. (1996), Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathology International*, 46: 473-485.
- Takahara M, Kang K, Liu L, Yoshida Y, McCormick TS, Cooper KD (2003). iC3b arrests monocytic cell differentiation into CD1c-expressing dendritic cell precursors: a mechanism for transiently decreased dendritic cells in vivo after human skin injury by ultraviolet B. *J Invest Dermatol* 120:802-9.
- Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M, Imokawa G (1994). Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. *Br J Dermatol* 131:641-8.
- Tao W, Levine AJ (1999). Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 96(6): 3077-3080.
- Tarnok A, Ulrich H, Bocsi J (2010). Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A* 77A (1):6-10.
- Tasić V (1994). Osnovne histohemijske metode u patohistologiji. Lela, Beograd.
- Teunissen MB (1992). Dynamic nature and function of epidermal Langerhans cells in vivo and in vitro: a review, with emphasis on human Langerhans cells. *The Histochemical Journal* 24 (10):697-716.
- Tedesko AC, Martinez L, Gonzalez S (1997). Photochemistry and photobiology of actinic erytema: defensive and reparative cutaneous mechanisms // *Braz. J. Med. Biol. Res.* № 30(5): 561-575.
- Thiers BH, Maize JC, Spicer SS, Cantor AB (1984). The Effect of Aging and Chronic Sun Exposure on Human Langerhans Cell Populations. *Journal of Investigative Dermatology* 82: 223-226.
- Thurstan AS, Gibbs KN, Langton KA, Griffiths EMC et al. (2012). Chemical consequences of cutaneous photoageing. *Chemistry Journal* 6:34.
- Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19446-51.
- Tiedemann K, Malmstrom A, Westergren-Thorsson G (1997). Cytokine regulation of proteoglycan production in fibroblasts: separate and synergistic effects. *Matrix Biol* 15:469-78.
- Tilli CM, VanSteensel MA, Krekels GA (2005). Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 152:1108-24.
- Timpl R (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 8: 618-24.
- Tirache I, Morliere P (1995). Involvement of singlet oxygen in ultraviolet A-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 287: 338-40.
- Tobin DJ, Paus R (2001). Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Exp Gerontol* 36:29-54.
- Tobin DJ (2011). The cell biology of human hair follicle pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24:75-88.
- Tomasek J, Gabbiani G, Hinz B, et al. (2002). Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Mol Cell Biol* 3:349-63.
- Tomas D (2009). Apoptosis, UV-radiation, precancerosis and skin tumors. *Acta Med Croatica* 63 Suppl 2:53-8.
- Toyoda M, Bhawan J (1997). Ultrastructural evidence for the participation of Langerhans cells in cutaneous photoaging processes: a quantitative comparative study. *J Dermatol Sci* 14:87-100.
- Toyoda M, Nakamura M, Luo Y, Morohashi M (2001). Ultrastructural characterization of microvasculature in photoaging. *J Dermatol Sci* 27 Suppl 1:32-41.
- Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW (1980). Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol.* 124(1):445-53.
- Trifunović A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417-23.
- Trinchieri G (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol* 9(1):17-23.
- Trüeb B, Schreier T, Bruckner P, Winterhalter KH (1987). Type VI collagen represents a major fraction of connective tissue collagens. *Eur J Biochem.* 166(3):699-703.
- Tsukahara, K., Y. Takema, et al. (2001). Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. *J Invest Dermatol* 117(3): 671-7.
- Uitto J, Christiano AM (1993). Dystrophic forms of epidermolysis bullosa. *Semin Dermatol* 12:191-201.

- Uitto J, Fazio MJ, Olsen DR (1989). Molecular mechanisms of cutaneous aging: age associated connective tissue alterations in the dermis. *J Am Acad Dermatol* 21: 614-22.
- Uitto J (1993): Collagen. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds.). *Dermatology in General Medicine* 4th Ed. McGraw Hill Book Company, New York, NY, pp 299–315.
- Uitto J, Piekstein EF (1998). Molecular mechanisms of cutaneous ageing: connective tissue alterations in the dermis *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 3(1): 41-44.
- Uitto J (2008). The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Drug Dermatol* 7:12-6.
- Ulger H, Erdogan N, Kumanlioglu S, Unur E (2003). Effect of age, breast size, menopausal and hormonal status on mammographic skin thickness. *Skin Res Technol* 9 (3):284-9.
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA and Amento EP (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 153, 557-562.
- Urano Y, Asano T, Yoshimoto K et al. (1995). Frequent p53 accumulation in the chronically sun-exposed epidermis and clonal expansion of p53 mutant cells in the epidermis adjacent to basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 104:928-32.
- Urmacher CD (1997): Normal Skin. In: Sternberg SS(ed). *Histology for Pathologists*. 2nd edn. Philadelphia: Lippincott-Raven, p 25–45.
- Vancoillie G, Lambert J, Mulder A, Koerten HK, Mommaas AM, Van Oostveldt P, Naeyaert JM (2000). Kinesin and Kinectin can Associate with the Melanosomal Surface and Form a Link with Microtubules in Normal Human Melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 114(3): 421-9.
- Van Den Bossche K, Naeyaert J-M, Lambert J (2006). The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer. *Traffic* 7(7): 769-78.
- Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh GG, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 211: 487-501.
- Van Remmen H, Ward WF, Sabia RV, Richardson A (1995). Gene expression and protein degradation. In: *Handbook of Physiology*. Ed. Masoro EJ, Oxford University Press, New York: 171-234.
- Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Saeland S (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12:71-81.
- Varani J, Warner RL, Gharraee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chung JH, et al. (2000). Vitamin A antagonizes decrease cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol* 114:480-6.
- Varani J, Dame MK, Rittie L, et al. (2006). Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol* 168:1861-68.
- Varani J, Schuger L, Dame MK, Leonard C, Fligiel SE, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ (2004). Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J Invest Dermatol* 122: 1471-79.
- Varani J, Zeigler M, Dame MK, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ et al (2001). Heparin-binding epidermal-growth-factor-like growth factor activation of keratinocyte ErbB receptors mediates epidermal hyperplasia, a prominent side-effect of retinoid therapy. *J Invest Dermatol* 117:1335-41.
- Varadi DP (1972). Studies on the chemistry and fine structure of elastic fibers from normal adult skin. *J Invest Dermatol* 59: 238-46.
- Vaziri H, Benchimol S (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 26: 279-82.
- Verdier-Sévrain S, Bonté F, Gilchrist B (2006). Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol* 15:83–94.
- Verdier-Sevrain S (2007). Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators. *Climacteric*, 10(4):289-297.
- Vermeer M, Streilein JM (1990). Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans' cells are mediated in part by tumour necrosis factor- α . *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 7:258-65.
- Verzar F (1964). Ageing of the collagen fibre. *Int.Rev.Conn.Tissue Res.* 2:243.
- Vicari AP, Vanbervliet B, Massacrier C, Chiodoni C, Vaure C, Ait-Yahia S, Dercamp C, Matsos F, Reynard O, Taverne C, Merle P, Colombo MP, O'Garra A, Trinchieri G, Caux C (2004). Novartis Found. Symp. 256: 241-54 discussion 254-69.
- Vidal D, Matias-Guiu X, Alomar A (2004). Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis. *Br J Dermatol* 151:656-62.
- Virador V, Muller J, Wu X, et al (2002). Influence of α -melanocyte stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *FASEB J* 16:105–107.
- Vishwanath M, Nishibu A, Saeland S et al. (2006). Development of intravital intermittent confocal imaging system for studying Langerhans cell turnover. *J Invest Dermatol* 126:2452–7.
- Витрук ТЮ (2008). Особенности изменений клеточно-матриксных взаимоотношений в коже при ее хронологическом и фотоиндуцированном старении. Дисс.к.м.н. Томск: ГОУВПО «Сибирский государственный медицинский университет», 125 с.
- Витрук ТЮ, Пестерев ПН, Рязанцева НВ, Мирутюмова ТЛ, Беляева АЮ (2005). Изменения пролиферации дермальных фибробластов при старении кожи // *Успехи современного естествознания*. 12:69-99.

- Vitruk TYu, Ryazantseva NV, Pesterev PN, Mustafina LR (2008). Features of the apoptosis markers expression by skin cell with ageing *Бюллетеньсибирской медицины* 2: 23-29.
- Voeikov VL (2006). Reactive oxygen species- (ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. *J Altern Complement Med* 12(2): 111-8.
- Vogel HG (1983). Effect of age on biomechanical and biochemical properties of rat and human skin. *J Soc Cosmet Chem* 34: 453-63.
- Vollmar B, Morgenthaler M, Amon M, Menger MD (2000). Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:1591-9.
- Vrndić O, Kostić I, Jeftić I, Stanojević M i sar. (2010). Patofiziološki mehanizmi procesa starenja. *Med. čas.*3:30-36.
- Waaijer Mariette EC et al. (2012). Morphometric skin characteristics dependent on chronological and biological age: the Leiden Longevity Study AGE 34:1543–52.
- Walsh LJ, Seymour GL, Powell RN (1990). Human gingival Langerhans cells stimulate allogeneic lymphocytes: requirement for MHC class II antigens. *J Parodontol* 61:328-33.
- Walsh LJ (2003). Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 14 (3):188-98.
- Wallace DC (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359–407.
- Wallace DC, Lott MT, Procaccio V (2006). Mitochondrial genes in degenerative diseases, cancer and aging. In: Rimoin DL, Connor JM.
- Wallace DC, Brown MD, Melov S, Graham B, Lott M (1998). Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors* 7(3): 187-90.
- Wang SQ et al. (2001). Ultraviolet A and melanoma: a review. *A Am Acad Dermatol* 44(5): 837-46.
- Wang F, Garza LA, Cho S, Kafi R, Hammerberg C, Quan T, Hamilton T, Mayes M, Ratanatharathorn V, Voorhees JJ, Fisher GJ, Kang S (2008). Effect of increased pigmentation on the antifibrotic response of human skin to UV-A1 phototherapy. *Arch Dermatol* 144: 851–58.
- Wassberg C, Backwall H, Diffey B et al. (2003). Enhanced epidermal ultraviolet responses in chronically sun-exposed skin are dependent on previous exposure. *Acta Derm Venerol* 83(4): 254-61.
- Wäster PK, Öllinger KM (2009). Redox-Dependent Translocation of p53 to Mitochondria or Nucleus in Human Melanocytes after UVA-and UVB-Induced Apoptosis. *J Invest Dermatol* 129: 1769-81.
- Watt FM (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* 21(15): 3919-26.
- Watt FM, Fujiwara H (2011). Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (4): a005124.
- Watson Reb, Parry EJ, Humphries JD, Jones Cjp, Polson DW, Kielty CM, Griffiths CeM (1998). Fibrillin microfibrils are reduced in skin exhibiting striae distensae. *Br J Dermatol* 138, 931–937.
- Watson RE, Griffiths CEM, Craven NM, Shuttleworth CA, Kielty CM (1999). Fibrillin-Rich Microfibrils are Reduced in Photoaged Skin. Distribution at the Dermal–Epidermal Junction. *J Invest Dermatol* 112(5): 782–7.
- Watson RE, Ball SG, Craven NM, Boorsma J, East CL, Shuttleworth CA, Kielty CM, Griffiths CE (2001). Distribution and expression of type VI collagen in photoaged skin. *Br J Dermatol*. 144(4):751-9.
- Weber S, Krüger-Krasagakes S, Grabbe J, Zuberbier T, Czarnetzki BM (1995). Mast cells. *International Journal of Dermatology* 34: 1–10.
- Weidner N, Austen KF (1993). Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract* 189:156-62.
- Wei YH, Lee HC (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 227: 671-82.
- Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC (2001). Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease- consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 44:1–11.
- Welgus HG, Campbell EJ, Cury JD, Eisen AZ, Senior RM, Wilhelm SM, Goldberg GI (1990). Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest* 86:1496–502.
- Wenk J, Schuller J, et al. (2004). Overexpression of phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in human dermal fibroblasts abrogates UVA irradiationinduced expression of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1 by suppression of phosphatidylcholine hydroperoxide-mediated NFkappaB activation and interleukin-6 release. *J Biol Chem* 279(44): 45634-42.
- Wertzp W (2000). Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol* 208: 7-11.
- West MD (1994). The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch Dermatol* 130:87-95.
- Whitton JT, Everall JD (1973). The thickness of the epidermis. *Br J Dermatol* 89: 467-76.
- Whiteman DC, Parsons PG, Green AC (1999). Determinants of melanocyte density in adult human skin. *Arch Dermatol Res* 291: 511–516.
- Whiteley HJ, Horton DL (1963). The effect of age on the mitotic activity of the ear epithelium in the CBA mouse. *J Gerontol* 18: 335-339.
- Wilhelm SM, Collier IE, Kronberger A, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Bauer EA, Goldberg GI (1987). Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6725–9.
- Wurm EMT, Claudia ES, Curchin MB et al. (2012). Confocal features of equivocal facial lesions on severely sun-damaged skin: Four case studies with dermatoscopic, confocal, and histopathologic correlation *J Am Acad Dermatol* 66: 463–73.

- Waller JM, Maibach HI (2006). Thickness of Aging Skin In the: A Dermatological View-Cutaneous Blood Flow in Aging Skin.
- Wickens AP (2001). Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol* 128(3), 379-91.
- Wikonkal NM, Brash DE (1999). Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4(1):6-10.
- Williams JD, Bermudez Y, Park SL, Stratton SP, Uchida K, Hurst CA, Wondrak GT (2014). Malondialdehyde-derived epitopes in human skin result from acute exposure to solar UV and occur in nonmelanoma skin cancer tissue Original Research Article *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 132(5): 56-65.
- Wilson AJ, Maddox PH, Jenkins D (1991). CD1a and S100 antigen expression in skin Langerhans cells in patients with breast cancer. *J Pathol*. 163(1): 25-30.
- Windsor LJ, Grenett H, Birkedal-Hansen B, Bodden MK, Engler JA, Birkedal-Hansen H (1993). Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. *J Biol Chem* 268(23):17341-7.
- Wlaschek M, Tanchcheva-Poór I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, et al. (2001). Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* 63:41-51.
- Wlaschek M, Heinen G, Poswig A, Schwarz A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K (1994). UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase:MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem Photobiol* 59(5):550-6.
- Wood GS, Morhenn VB, Butcher EC, Kosek J (1984). Langerhans cells react with panleukocyte monoclonal antibody: ultrastructural documentation using a live cell suspension immunoperoxidase technique. *J Invest Derm* 82(4):322-5.
- Wolff K, Winkelmann RK (1967). Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 48:50-4.
- Wondrak GT, Roberts MJ, Cervantes-Laurean D, Jacobson MK, Jacobson EL (2003). Proteins of the Extracellular Matrix Are Sensitizers of Photo-oxidative Stress in Human Skin Cells *J Invest Dermatol* 121: 578-586.
- Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL (2006). Endogenous UVA photosensitizers: Mediators of skin photodamage and novel targets for photoprotection. *Photochem Photobiol Sci* 5: 215-237.
- Wulf HC, Sandby-Møller J, Kobayashi T, Gniadecki R (2004). Skin aging and natural photoprotection. *Micron* 35:185-91.
- Wu X, Rao K, Bowers MB, Copeland NG, Jenkins NA, Hammer JA (2001). Rab27a Enables Myosin Va-Dependent Melanosome Capture by Recruiting the Myosin to the Organelle. *Journal of Cell Science* 114(Pt 6): 1091-100.
- Yaar M, Gilchrist BA (2001). Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. *Clin Exp Dermatol* 26:583-91.
- Yaar M, Gilchrist BA (1998). Aging versus photoaging: Postulated mechanisms and effectors. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3: 47-51.
- Yaar M, Gilchrist BA (2003). Aging of skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz S, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. New York: McGraw-Hill; pp. 1386-98.
- Yaar M, Gilchrist BA (2007). Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol* 157(5): 874-87.
- Yamashita T, Kuwahara T, Gonzalez S, Takahashi M (2005). Non-Invasive Visualization of Melanin and Melanocytes by Reflectance-Mode Confocal Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology* 124(1): 235-40.
- Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ (2007). The regulations of skin pigmentation. *J Biol Chem*. 13:1-11.
- Yamaguchi Y, Hearing VJ (2009). Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35(2): 193-9.
- Yano K, Brown LF, Detmar M (2001). Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J. Clin. Invest.*;107:409-417.
- Yano K, Oura H, Detmar M (2002). Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo-damage. *J Invest Dermatol* 118:800-805.
- Yano K, Kajiya K, Ishiwata M, et al. (2004). Ultraviolet B-induced skin angiogenesis is associated with a switch in the balance of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression. *J Invest Dermatol* 122(1):201-8.
- Yano K, Kadoya K, Kajiya K, Hong YK, Detmar M (2005). Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1. *Br J Dermatol* 152(1): 115-21.
- Yassin TM, Toner PG (1976). Langerhans cells in the human esophagus. *J Anat* 122(Pt 2):435-45
- Yasui H, Sakurai H (2000). Chemiluminiscent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Bioch Bioph Res Comm* 269: 131-6.
- Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H (1999). Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin – relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res* 291:555-9.
- Yen A, Braverman IM (1976). Ultrastructure of the human dermal microcirculation: the horizontal plexus of the papillary dermis. *J Invest Dermatol* 66(3): 131-42.
- Yin Q, Xu X, Lin Y, Lv J, Zhao L, He R (2014). Ultraviolet B irradiation induces skin accumulation of plasmacytoid dendritic cells: a possible role for chemerin. *Autoimmunity* 47(3):185-92.
- Yoshida Y, Kang K, Berger M, Chen G, Gilliam AC, Moser A et al. (1998). Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin. *J Immunol* 1 161: 5873-9.
- Yoshihisa Y, Norisugi O, Matsunaga K, Nishihira J, Shimizu T (2014). Involvement of MIF in Basement Membrane Damage in Chronically UVB-Exposed Skin in Mice. *PLoS ONE* 9(2): e89569.
- Young AJ (1991). Effects of aging on human cold tolerance. *Exp Aging Res* 17: 205-13.
- Young H, Steele T, Bray R, et al. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 264:51-62.

- Young AR, Potten CS, Chadwick CA, Murphy GM, Cohen AJ (1988). Inhibition of UV radiation-induced DNA damage by a 5-methoxypsoralen tan in human skin. *Pigment Cell Res* 1:350–354.
- Young AR, Potten CS, Chadwick CA, Murphy GM, Hawk JL, Cohen AJ (1991). Photoprotection and 5-MOP photochemoprotection from UVR-induced DNA damage in humans: the role of skin type. *J Invest Dermatol* 97:942–948.
- You YH et al. (2001). Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutation induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem* 276(48):44688–94.
- Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA (2007). Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest* 117: 2517–25.
- Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA (2009). Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol*. 129(2):302–8.
- Zagrodnik B, Kempf W, Seifert B et al. (2003). Superficial radiotherapy for patients with basal cell carcinoma: recurrence rates, histologic subtypes, and expression of p53 and Bcl-2. *Cancer* 98(12):2708–14.
- Zhang Y, McCluskey K, Fujii K, Wahl LM (1998). Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF- α , granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 β through prostaglandin-dependent and - independent mechanisms. *J Immunol* 161:3071–6.
- Zhou Y, Lee HST, Kooshesh F, Fujisawa H, Sauder DN, Kondo S (1996). Effects of UVB irradiation on keratinocyte growth factor (KGF) and receptor (KGFR) expression in cultured human keratinocytes. *Exp Dermatol* 5:138–44.
- Zhao Y, Bernard D and Wang S (2013). Small Molecule inhibitors of MDM2-p53 and MDMX-p53 interaction as new cancer therapeutics. *BioDiscovery* 8: 4.
- Zimmerli SC, Hauser C (2007). Langerhans cells and lymph node dendritic cells express the tight junction component claudin-1. *J Invest Dermatol* 127:2381–90.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M, Bruckner-Tuderman L (1994). Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol* 124:817–825.
- Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Dshapiro PE, Bale AE, et al. (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the a53 gene of nonmelanoma skin cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4216–20.
- Zmijewski MA, Slominski AT (2011). Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis. *Dermatoendocrinol* 3: 3–10.
- Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C (2008). Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol* 43:986–97.
- Zouboulis CC, Boschnakow A (2001). Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland. *Clin Exp Dermatol*. 26(7):600–7.
- Zouboulis C, Makrantonaki E (2011). Clinical aspect and molecular diagnostics of skin aging. *Clin in Dermatol* 29: 3–14.
- Zorina AI, Bozo YaI, Zorin VL, Cherkasov VR, Deev RV (2011). Derma fibroblasts: peculiarities of cytogenesis, histophysiology and possible clinical use Клеточная трансплантология и тканевая инженерия Том VI, № 2.
- Загорученко Е.А. (1973). Эмбриональное развитие и топографическая гистология кожи человека: Автореф. дис. докт. мед. наук. Москва-32 с.
- Šerban NM (1995). Pokretne i nepokretne ćelije - uvod u histologiju. Savremena administracija, Beograd.
- Шехтер АБ, Берченко ГН (1978). Фибробласты и развитие соединительной ткани: ультраструктурные аспекты биосинтеза, фибриллогенеза и катаболизма коллагена. *Архив патологии* 8:70.
- Швецова ЕВ (2009). Патофизиологические механизмы регенерации кожи под действием мезенхимальных клеток : диссертация, Москва.
- Чумаков ПМ (2007). Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. *Успехи биол. химии*. 47: 3–52.
- Жижина ГП (2002). Роль апоптоза в нормальном онтогенезе, патогенезе и старении / Г. П. Жижина // Клиническая геронтология. № 4-С. 3-10.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Снежана Лештаревић

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Хистолошка студија узрасних промена људске коже на фотоекспонираним и фотонеекспонираним регијама“.

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

Снежана Лештаревић

У Косовској Митровици, 25.05. 2015. год.

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Снежана Лештаревић

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада „Хистолошка студија узрасних промена људске коже на
фотоекспонираним и фотонеекспонираним регијама“.

Ментор : Проф.др Горана Ранчић

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Потпис докторанда

У Косовској Митровици, 25.05. 2015.

Снежана Лештаревић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Хистолошка студија узрасних промена људске коже на фотоекспонираним и фотонеекспонираним регијама“.
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

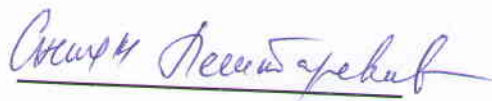
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

① Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда



У Косовској Митровици, 25.05.2015.